



Universitat de Lleida

## **Estudi de la implicació del sistema nerviós perifèric i de la resposta autoimmunitària dels limfòcits B anti-periferina en del decurs de la Diabetis Mellitus Tipus 1 en el model NOD**

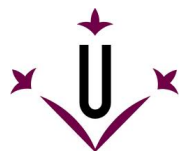
Berta Arpa i Puigdemont

**Dipòsit Legal: L.1223-2014**  
<http://hdl.handle.net/10803/284846>

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

**WARNING.** Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



Departament de Medicina Experimental  
Universitat de Lleida



# ESTUDI DE LA IMPLICACIÓ DEL SISTEMA NERVIÓS PERIFÈRIC I DE LA RESPOSTA AUTOIMMUNITÀRIA DELS LIMFÒCITS B ANTI-PERIFERINA EN EL DECURS DE LA DIABETIS MELLITUS TIPUS 1 EN EL MODEL NOD

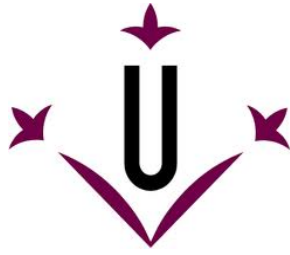
BERTA ARPA I PUIGDEMONT

Director: Dr. Joan Verdaguer i Autonell

Setembre 2014







La tesi doctoral titulada " Estudi de la implicació del sistema nerviós perifèric i de la resposta autoimmunitària dels limfòcits B anti-periferina en el decurs de la Diabetis Mellitus Tipus 1 en el model NOD" ha estat realitzada per Na Berta Arpa i Puigdemont, sota la direcció del Dr. Joan Verdaguer i Autonell, en major part en els laboratoris de la Unitat d'Immunologia, de la Universitat de Lleida/ IRBLleida, i una petita part en el laboratori d'Immunologia de l'Institut de Recerca Biomèdica Germans Trias i Pujol de Badalona.

Els treballs de recerca d'aquesta memòria s'han finançat a través del projecte de recerca "*Caracterización de la respuesta de linfocitos B autoreactivos contra un nuevo autoantígeno de 90 kDa específico de células beta pancreáticas durante el desarrollo de la Diabetes Tipo 1*" amb el número de referència SAF2009-09215 del *Ministerio de Ciencia e Innovación* del govern espanyol, i "*Role of nervous system reactive-B-lymphocytes in the course of T1D*" amb el número de referència 5-2005-1133, de la fundació nord-americana *Juvenile Diabetes Research Foundation International*.

La doctoranda

El director de tesi

Berta Arpa i Puigdemont

Dr. Joan Verdaguer i Autonell

Professor Agregat, Immunologia  
Dept. Medicina Experimental  
Universitat de Lleida



*“Faig, desfaig, obro, tanco,  
enderroco, construeixo,  
lligo i deslligo i fujo i torno i vaig  
i vinc i caic, però m'aixeco.”*

*Miquel Martí i Pol*



# **ÍNDEX**

<b>I- RESUMS</b>	<b>13</b>
<b>II- ABREVIATURES</b>	<b>21</b>
<b>III- INTRODUCCIÓ</b>	<b>23</b>
<b>1.-Limfòcits B</b>	<b>25</b>
<b>1.1. Desenvolupament dels limfòcits B</b>	<b>26</b>
1.1.1. Primera etapa: Desenvolupament dels limfòcits B a medul·la òssia	26
<b>1.2. Activació dels limfòcits B</b>	<b>29</b>
1.2.1. Activació de manera T- dependent	29
1.2.2. Activació de manera T- independent	35
1.2.3. Limfòcits B reguladors	37
<b>1.3. El receptor dels limfòcits B</b>	<b>38</b>
1.3.1. Unió antígen-anticòs	40
<b>1.4. Tolerància i autoimmunitat en els limfòcits B</b>	<b>41</b>
1.4.1. Tolerància central	41
1.4.2. Tolerància perifèrica	42
1.4.3. Autoimmunitat i limfòcits B	43
<b>2.- La diabetis mellitus tipus 1</b>	<b>45</b>
<b>2.1. Pàncrees</b>	<b>46</b>
<b>2.2. Sistema nerviós i T1D</b>	<b>47</b>
<b>2.3. Epidemiologia</b>	<b>48</b>
<b>2.4. Etiologia</b>	<b>48</b>
2.4.1. Factors genètics	49
2.4.2. Factors ambientals	50
2.4.3. Factors estocàstics	52
<b>2.5. Histopatologia</b>	<b>52</b>
<b>2.6. Mecanismes efectors</b>	<b>53</b>
2.6.1. Els limfòcits T	53
2.6.2. Els limfòcits B	54
<b>2.7. Perspectives de futur</b>	<b>58</b>
<b>3.- Models animals</b>	<b>58</b>
<b>3.1. Model NOD</b>	<b>59</b>
3.1.1. Variacions del model NOD	60
<b>4.- Estudis previs</b>	<b>61</b>
<b>IV- HIPÒTESI I OBJECTIUS</b>	<b>65</b>
<b>1. Hipòtesi</b>	<b>67</b>
<b>2. Objectiu</b>	<b>67</b>
2.1. Objectius específics:	67
<b>V- MATERIAL I MÈTODES</b>	<b>69</b>
<b>1.- Ratolins</b>	<b>71</b>
1.1. Estabulació i manteniment	71
1.2. Ratolins de la colònia	71
1.3. Genotipatge animals	72
1.3.1. Obtenció DNA	72
1.3.2. Preparació de la reacció PCR	73
<b>2.- Obtenció de mostres i tincions</b>	<b>76</b>
2.1. Obtenció de sèrum	76

2.2. Congelació dels òrgans .....	77
2.3. Obtenció de crioseccions .....	77
2.4. Tinció histològica mitjançant hematoxilina-eosina .....	77
2.5. Avaluació de la infiltració leucocitària .....	78
2.6. Tinció dels teixits mitjançant immunofluorescència .....	79
2.7. Obtenció dels ganglis raquidis i tincions .....	81
2.7.1. Fixació dels animals.....	81
2.7.2. Extracció dels ganglis raquidis .....	82
2.7.3. Criopreservació i crioseccions dels ganglis.....	83
2.7.4. Inclusió en parafina .....	83
2.7.5. Tincions hematoxilina-eosina .....	84
2.7.6. Talls semifins i microscòpia electrònica.....	85
2.7.7. Tinció dels ganglis mitjançant immunofluorescència .....	85
<b>3.- Western blot.....</b>	<b>86</b>
3.1. Preparació de les mostres.....	86
3.2. Electroforesis en gels de poliacrilamida .....	86
3.3. Transferència a la membrana de nitrocel·lulosa .....	87
3.4. Detecció immunoquímica .....	88
<b>4.- Citometria .....</b>	<b>90</b>
4.1. Obtenció de suspensions cel·lulars.....	90
4.1.1. Obtenció de limfòcits infiltrants a illots pancreàtics.....	90
4.1.2. Disgregació i hemòlisi de la melsa .....	91
4.1.3. Obtenció i disgregació de les plaques de Peyer.....	92
4.1.4. Obtenció de cèl·lules peritoneals.....	93
4.2. Marcatge d'antígens de superfície.....	93
4.3. Comptatge dels nobres absoluts .....	94
4.4. Anàlisi dels resultats.....	95
<b>5.- Estudis <i>in vitro</i>: Proliferació cel·lular.....</b>	<b>95</b>
5.1. Proliferació de limfòcits B procedents de melsa .....	95
5.1.1. Purificació dels limfòcits B de melsa.....	95
5.1.2. Estimulació dels limfòcits B .....	96
5.1.3. Incorporació de Timidina tritiada, <sup>3</sup> [H]-TdR.....	97
5.2. Proliferació de limfòcits B cultivats amb periferina .....	98
5.2.1. Preparació de la placa de cultiu cel·lular .....	98
5.2.2. Extracció i marcatge dels limfòcits .....	98
5.2.3. Estimulació dels limfòcits .....	99
5.2.4. Càlcul de proliferació .....	99
5.3. Proliferació cel·lular de limfòcits procedents dels illots pancreàtics.....	101
5.3.1. Extracció i marcatge dels limfòcits .....	101
5.3.2. Estimulació dels limfòcits .....	102
<b>6.- Estudis <i>in vivo</i> .....</b>	<b>102</b>
6.1. Tractament amb el pèptid DD04107 en la soca NOD.RAG2-/-.....	103
6.2. Tractament amb el pèptid DD04103 en la soca NOD .....	103
<b>7.- Càlculs estadístics .....</b>	<b>103</b>
<b>VI- RESULTATS .....</b>	<b>105</b>
1.- Expressió de la periferina en els ratolins knockout.....	107
2.- Desenvolupament de la malaltia en la soca NOD.Per-/-.....	108
2.1. Evolució de la infiltració .....	108
2.2. Incidència de la diabetis en la soca NOD.Per-/- .....	109

<b>3.- Estudi dels ganglis espinals .....</b>	<b>110</b>
3.1. Estudi de la soca NOD.....	110
3.2. Estudi de la soca C57BL/6 .....	111
3.3. Estudi de la soca NOD.Per-/-.....	111
3.4. Estudi de la soca NOD.RAG2-/- .....	112
3.5. Estudi de la soca NOD.RAG2-/- a les 2 setmanes .....	114
3.6. Estudi per microscòpia electrònica .....	114
3.7. Estudi de la infiltració leucocitària .....	115
3.8. Estudi de la substància p .....	115
<b>4.- Tractament amb el pèptid DDO4107.....</b>	<b>117</b>
4.1. Tractament als animals de la soca NOD.RAG2-/- .....	117
4.2. Tractament als animals de la soca NOD.....	118
<b>5.- Anàlisi d'expressió dels transgens .....</b>	<b>119</b>
5.1. Expressió de IgM.....	119
5.2. Expressió de la IgD.....	120
5.3. Producció d'immunoglobulina secretada.....	121
<b>6.- Desenvolupament de la malaltia en la soca 280.IgH.NOD .....</b>	<b>122</b>
6.1. Evolució de la infiltració .....	123
6.2. Incidència de la diabetis de la soca 280.IgH.NOD.....	124
<b>7.- Incidència de la diabetis en la soca 280.IgH.NOD.Per-/-.....</b>	<b>125</b>
<b>8.- Estudi funcional i fenotípic dels limfòcits B a melsa del ratolí 280.IgH.NOD .....</b>	<b>126</b>
8.1. Estudi dels limfòcits B presents a melsa .....	126
8.2. Distribució dels limfòcits B a la melsa .....	127
8.3. Subpoblacions de limfòcits B a melsa .....	128
8.3.1. Limfòcits B fol·liculars, de zona marginal, transicionals de tipus 1 i transicionals de tipus 2 .....	128
8.3.2. Limfòcits B1a i B1b.....	131
<b>9.- Diferències fenotípiques entre els limfòcits B procedents de la soca 280.IgH.NOD i la soca NOD .....</b>	<b>133</b>
9.1. Expressió de la molècula CD19.....	133
9.2. Expressió de la IgM.....	134
9.3. Expressió de la IgD.....	135
9.4. Expressió de molècules coestimuladores CD80 i CD86 .....	136
9.5. Expressió de molècules MHC I/ II .....	137
<b>10.- Estudis <i>in vitro</i> de limfòcits B procedents de melsa.....</b>	<b>138</b>
10.1. Proliferació cel·lular.....	138
10.2. Expressió de molècules coestimuladores i MHC.....	140
10.3. Estudi de la proliferació dels limfòcits B co-cultivats amb limfòcits T. ....	142
10.4. Estudi de les subpoblacions de limfòcits B després de la proliferació.....	143
<b>11.- Anàlisi de l'infiltrat leucocitari present als illots pancreàtics .....</b>	<b>145</b>
11.1. Distribució dels limfòcits T i B en l'infiltrat dels illots pancreàtics .....	145
11.2. Relació entre els limfòcits T i B en l'infiltrat.....	146
11.3. Caracterització dels limfòcits B infiltrants als illots.....	147
<b>12.- Diferències fenotípiques entre els limfòcits B de melsa i els limfòcits B que infiltrin els illots pancreàtics.....</b>	<b>148</b>
12.1. Expressió de la molècula CD19 .....	148
12.2. Expressió de la IgM .....	149



12.3 Expressió de la IgD .....	149
12.4. Expressió de molècules coestimuladores CD80 i CD86 .....	150
12.5. Expressió de molècules MHC I/ II.....	151
<b>13.- Estudis <i>in vitro</i> de limfòcits B procedents d'illot .....</b>	<b>152</b>
13.1. Proliferació dels limfòcits procedents d'illot.....	152
13.2. Estudi de les subpoblacions de limfòcits B infiltrantsts als illots pancreàtics després de la proliferació.....	153
<b>14.- Estudi dels limfòcits B de la cavitat peritoneal.....</b>	<b>155</b>
14.1. Estudi de les poblacions B1a i B1b de la cavitat peritoneal.....	155
14.2. Estudi de l'expressió de IgM dels limfòcits B presents a la cavitat peritoneal .....	156
14.3. Caracterització fenotípica dels limfòcits B presents a la cavitat peritoneal .....	157
<b>15.- Estudi dels limfòcits B presents a les plaques de Peyer .....</b>	<b>158</b>
15.1. Caracterització dels limfòcits B presents a les plaques de Peyer .....	158
15.2. Estudi d'expressió de IgM en els limfòcits B presents a les plaques de Peyer .....	159
<b>16.- Incidència de la soca 280.IgH.IgL.NOD .....</b>	<b>160</b>
<b>17.- Estudi de les subpoblacions de limfòcits B melsa de ratolí en la soca 280.IgH.IgL.NOD.....</b>	<b>162</b>
17.1. Limfòcits B fol·liculars, de zona marginal, transicionals de tipus 1 i transicionals de tipus 2 .....	162
17.2. Estudis dels limfòcits fol·liculars i de zona marginals en nombre absoluts .....	164
17.3. Estudi dels limfòcits B1a i B1b.....	165
<b>18.- Estudi fenotípic dels limfòcits B a melsa del ratolí 280.IgH.IgL.NOD.....</b>	<b>165</b>
18.1. Expressió de la molècula CD19 .....	165
18.2. Expressió de la IgM .....	166
18.3. Expressió de la IgD .....	167
18.4. Expressió de molècules coestimuladores i MHC.....	167
18.4.1. Expressió de CD80 i CD86.....	167
18.4.2. Expressió H <sub>2</sub> k <sup>d</sup> i I-Ag7 .....	168
<b>19.- Anàlisi de l'infiltrat leucocitari de la soca 280.IgH.IgL.NOD.....</b>	<b>169</b>
19.1. Distribució dels limfòcits T i B en l'infiltrat dels illots pancreàtics .....	169
19.2. Relació dels limfòcits T i B en l'infiltrat .....	170
19.3. Caracterització dels limfòcits B infiltrants a illot pancreàtic .....	171
<b>20.- Comparació d'expressió de molècules en els limfòcits B de melsa i infiltrants als illots pancreàtics.....</b>	<b>172</b>
20.1. Expressió de la molècula CD19 .....	173
20.2. Expressió de la IgM .....	173
20.3. Expressió de la IgD .....	174
20.4. Expressió de molècules coestimuladores i MHC.....	175
20.4.1 .Expressió de CD80.....	175
20.4.2. Expressió de CD86.....	176
20.4.3. Expressió H <sub>2</sub> k <sup>d</sup> .....	177
20.4.4. Expressió I-Ag7.....	178
<b>21.- Estudi dels limfòcits B a la cavitat peritoneal .....</b>	<b>178</b>
21.1. Poblacions B1 a la cavitat peritoneal.....	179
21.2. Expressió de IgM en poblacions B1 i B2.....	180

<b>22.- Resum dels resultats observats .....</b>	<b>182</b>
22.1. Evolució de la malaltia en les diferents soques.....	182
22.2. Limfòcits B presents a melsa .....	183
22.3. Limfòcits B present en l'infiltrat leucocitari als illots pancreàtics.....	184
22.4. Limfòcits B presents a la cavitat peritoneal .....	185
<b>VII- DISCUSSIÓ .....</b>	<b>187</b>
<b>VIII- CONCLUSIONS.....</b>	<b>201</b>
<b>X- BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>205</b>



## I- RESUMS



## **Estudi de la implicació del sistema nerviós perifèric i de la resposta autoimmunitària dels limfòcits B anti-periferina en el decurs de la diabetis mellitus tipus 1 en el model NOD.**

La Diabetis mellitus tipus 1 (T1D) és una malaltia autoimmunitària que es caracteritza per la destrucció selectiva de les cèl·lules beta pancreàtiques productores d'insulina. Un dels millors models actuals de la malaltia és el ratolí NOD, el qual de manera espontània desenvolupa una forma de diabetis autoimmunitària molt semblant a la T1D humana. Estudis realitzats amb aquest model murí han revelat que tot i que els limfòcits T són els màxims responsables de la destrucció de les cèl·lules beta, els limfòcits B també són necessaris perquè la malaltia es desenvolupi. De fet, els limfòcits B infiltren els illots pancreàtics igual que ho fan els limfòcits T, la qual cosa suggereix un paper rellevant en el procés destructiu de les cèl·lules beta.

En un altre sentit, treballs portats a terme amb el model NOD han mostrat que de manera simultània a l'atac de les cèl·lules beta també es produeix una resposta autoimmunitària contra el sistema nerviós perifèric (SNP) que regula l'activitat dels illots pancreàtics.

Estudis previs del nostre grup han revelat que una part prevalent dels limfòcits B que infiltren els illots pancreàtics de ratolins NOD prediabètics i diabètics reconeixen la perifèrina, una proteïna que forma part del citoesquelet de les cèl·lules del SNP.

El treball de recerca que presentem en aquesta memòria ha tingut com a objectius principals aprofundir en l'estudi, per una banda, de la funció efectora dels limfòcits B en la T1D, i, per l'altra, del paper de les cèl·lules del SNP com a dianes en el procés de desenvolupament de la malaltia.

Amb aquest objectiu vàrem generar els ratolins NOD transgènics de limfòcits B, el 280.IgH.NOD i el 280.IgH.IgL.NOD, portadors de BCRs amb especificitat per la perifèrina, i per una altra banda el ratolí NOD knockout pel gen de la perifèrina, el ratolí NOD.Per<sup>-/-</sup>. L'estudi d'aquests models ha mostrat que en els ratolins 280.IgH.NOD i el 280.IgH.IgL.NOD la incidència de la malaltia s'incrementa i s'accelera el seu debut, mentre que en el ratolí NOD.Per<sup>-/-</sup> la incidència de la malaltia no varia en relació amb el ratolí NOD però en canvi sí que s'hi observa un retard lleuger en el debut. Això ens permet concloure que tot i que la perifèrina és diana de la malaltia de l'atac durant el procés diabetogènic, i per tant és un autoantigen rellevant en la resposta autoimmunitària en la T1D, la resposta contra altres autoantígens fa que aquesta resposta no sigui imprescindible per tal que el procés es desenvolupi plenament. També ens permet concloure que la resposta autoimmunitària contra el SNP està directament lligada al procés diabetogènic.

Els estudis fenotípics i funcionals dels limfòcits B dels ratolins 280.IgH.NOD i el 280.IgH.IgL.NOD han mostrat que aquests adquireixen el fenotip de limfòcit activat i amb funcions d'APCs, fet que explica els canvis observats en el desenvolupament de la malaltia en els models transgènics 280.IgH.NOD i 280.IgH.IgL.NOD.

Per últim, a través de l'estudi histològic dels ganglis raquidis (GR) que innerven els illots pancreàtics en els ratolins NOD, hem descobert que algunes neurones sensorials dels GR tenen alteracions citoplasmàtiques compatibles amb l'existència d'excitotoxicitat, que és un fenomen característic de processos neurodegeneratius. Hem observat que aquest procés es dona independentment de la resposta autoimmunitària en el ratolí NOD i sembla que fins i tot la precedeix.

En conjunt, creiem que aquests resultats indiquen que l'origen de la T1D podria ser un procés neurodegeneratiu, que induiria l'alliberació anòmala d'autoantígens neuronals, la captació i presentació anòmala d'aquests per part d'APCs com els limfòcits B, que en últim terme activarien limfòcits T autoreactius que atacarien les cèl·lules beta i les neurones del SNP. És a dir, que en un context de susceptibilitat a l'autoimmunitat, un procés neurodegeneratiu com l'observat en les neurones dels GRs podria significar el desencadenant del procés de resposta autoimmunitària contra el SNP i la pròpia cèl·lula beta.

## **Estudio de la implicación del sistema nervioso periférico i de la respuesta autoinmune de los linfocitos B anti-periferina en el desarrollo de la diabetes mellitus tipo 1 en el modelo NOD.**

La Diabetes mellitus tipo 1 (T1D) es una enfermedad autoinmune que se caracteriza por la destrucción selectiva de las células beta pancreáticas productoras de insulina. En la actualidad, uno de los mejores modelos de la enfermedad es el ratón NOD que de forma espontánea desarrolla una forma de la diabetes autoinmune muy parecida a la T1D humana. Estudios realizados con este modelo murino han revelado que aunque los linfocitos T son los máximos responsables de la destrucción de las células beta, los linfocitos B también son necesarios para el desarrollo de la enfermedad. De hecho, los linfocitos B infiltran los islotes pancreáticos del mismo modo que lo hacen los linfocitos T, sugiriendo de este modo un papel relevante en el proceso destructivo de las células beta.

En otro sentido, trabajos realizados con el modelo NOD han mostrado que de manera simultánea al ataque de las células beta, se produce una respuesta autoinmune contra el sistema nervioso periférico (SNP) que regula la actividad de los islotes pancreáticos.

Estudios previos de nuestro grupo han revelado que una parte prevalente de los linfocitos B que infiltran los islotes pancreáticos de los ratones NOD prediabéticos y diabéticos reconocen la periferrina, una proteína que conforma el citoesqueleto de las células del SNP.

El trabajo de investigación que presentamos en esta memoria ha tenido como objetivos principales profundizar en el estudio, por un lado, de la función efectora de los linfocitos B en la T1D, y por otro, el estudio del papel de las células del SNP como dianas en el ataque autoinmune.

Con este objetivo se generaron los ratones NOD transgénicos de linfocitos B, el 280.IgH.NOD y el 280.IgH.IgL.NOD, portadores de BCRs con especificidad para la periferrina, y el ratón NODPer<sup>-/-</sup>, un ratón knockout por el gen de la periferrina. El estudio de estos modelos ha mostrado que tanto en los ratones 280.IgH.NOD como en los 280.IgH.IgL.NOD la incidencia de la enfermedad se incrementa y se acelera el debut, mientras que en el ratón NOD.Per<sup>-/-</sup> la incidencia de la enfermedad no varía en comparación con el ratón NOD, pero, en cambio, se observa un ligero retraso en el debut de esta. Esto nos permite concluir que aunque la periferrina es diana del ataque durante el proceso diabetogénico, y por lo tanto es un autoantígeno relevante en la respuesta autoinmune en la T1D, la respuesta contra otros autoantígenos hace que la respuesta anti-periferrina no sea imprescindible para el desarrollo de la enfermedad. También nos permite concluir que la respuesta autoinmune contra el SNP está estrechamente relacionada con el proceso diabetogénico.

Los estudios fenotípicos y funcionales de los linfocitos B de los ratones 280.IgH.NOD y de los 280.IgH.IgL.NOD han mostrado que estos adquieren el fenotipo de linfocito activado con funciones de APCs, hecho que explica los cambios observados en el desarrollo de la enfermedad en ambos modelos transgénicos.



Por último, a través del estudio histológico de los ganglios raquídeos (GR) que inervan los islotes pancreáticos en los ratones NOD, hemos hallado que algunas neuronas sensoriales de los GR tienen alteraciones citoplasmáticas compatibles con la existencia de excitotoxicidad, fenómeno característico de procesos neurodegenerativos. Se ha observado que estos resultados podrían indicar que el origen de la T1D podría ser un proceso neurodegenerativo, que induciría a la liberación anómala de autoantígenos neuronales, la captación y presentación anómala de estos por parte de las APCS, como los linfocitos B, que en última instancia activarían los linfocitos T autoreactivos que atacarían las células beta y las neuronas del SNP. Por ello, en un contexto de susceptibilidad a la autoinmunidad, un proceso neurodegenerativo como el observado en las neuronas de los GRs podría significar el desencadenante de un proceso de respuesta autoinmune contra el SNP y la propia célula beta.

### **Role of anti-peripherin B lymphocytes and involvement of the peripheral nervous system in the course of type 1 diabetes in the NOD mouse model.**

Diabetes mellitus type 1 (T1D) is an autoimmune disease characterized by the selective destruction of insulin-producing beta cells. One of the best current models of the disease is the NOD mouse, which spontaneously develops a form of autoimmune diabetes similar to human T1D. Studies using this mouse model revealed that although T lymphocytes are the main responsible for the beta cell destruction, B lymphocytes are also required for disease development. In fact, B lymphocytes infiltrate pancreatic islets as do T cells, suggesting a relevant role in the beta cells destructive process.

Moreover, other studies have shown that concomitant to the beta cells attack, an autoimmune response against peripheral nervous system (PNS) also occurs.

Previous studies from our group have shown that a prevalent part of islet-infiltrating B lymphocytes infiltrating of NOD mice target Peripherin, a protein that forms part of the cytoskeleton of PNS neurons.

The main objectives of the present study were to explore the role of B cells in T1D, and to analyze the involvement of some functional defects of PNS neurons in promoting the disease.

For this purpose we generated the 280.IgH.NOD and the 280.IgH.IgL.NOD mice bearing BCRs with specificity for Peripherin, and on the NOD.Per<sup>-/-</sup> mouse knockout of the Peripherin gene. The results indicate that whereas diabetes incidence increases and disease onset accelerates in 280.IgH.NOD and 280.IgH.IgL.NOD, disease incidence is unchanged and diabetes onset is slightly delayed in NOD.Per<sup>-/-</sup>, compared to the NOD mouse. This allows us to conclude that although Peripherin is a target of the autoimmune response and therefore is a relevant autoantigen in T1D, it is not essential for the full development of the disease. Furthermore, the results allow us to conclude that the autoimmune response against PNS is directly linked to the diabetogenic process.

Further experiments in our study indicate that, after activation, B lymphocytes from 280.IgH.NOD and 280.IgH.IgL.NOD mice acquire the phenotype and function of APCs, which explains the observed changes in the development of the disease in these transgenic mice.

Finally, after histological analyses of dorsal root ganglion (DRG) from NOD mice, we found that some DRG sensory neurons have cytoplasmic changes compatible with excitotoxicity, which is a phenomenon characteristic of neurodegenerative diseases. We found that this phenomenon occurs independently of the autoimmune response and seems to even precede it.

Overall, these results indicate that the origin of T1D could be a neurodegenerative process in which, in the context of autoimmune susceptibility, released neuronal antigens could be abnormally uptaken and presented by APCs such as lymphocytes B, which would activate autoreactive T cells that ultimately would attack pancreatic beta cells and PNS neurons.



## II- ABREVIATURES

**AID** *Activation Induced cytidine Deaminase*

**APC** *cèl·lules presentadores d'antigen (Antigen Presenting Cells)*

**APRIL** *A proliferation inducing ligand*

**BAFF** *B-cell activating factor belonging to the TNF family*

**BCR** *receptor de limfòcit B (B-cell receptor)*

**CD** *marcadors de diferenciació (cluster differentiation )*

**CIA** *collagen-induced model*

**CLP** *common lymphoid progenitor*

**CMP** *comptes per minut*

**EAE** *encefalitis autoimmune experimental*

**FO** *Limfòcits B fol·liculars*

**CGRP** *calcitonin-gene-related peptide*

**GFAP** *glial fibrillary acidic protein*

**GR** *ganglis raquídis*

**GWAS** *Genome-Wide Association Studies*

**HLA** *antigen leucocitari humà*

**HSC** *hematopoietic stem cells*

**ICAs** *anticossos contra antígens dels illots*

**IDDM** *Insulin Dependent Diabetes Mellitus*

**IFN** *interferó*

**Ig** *immunoglobulina*

**IL** *interleucina*

**ITAMS** *immunoreceptor tyrosine based activation motif*

**LADA** *latent autoimmune diabetes of adults*

**LES** *lupus eritematós sistèmic*

**MCC** *medi de cultiu complet*

**MHC** *complex d'histocompatibilitat principal (Major Histocompatibility Complex)*

**MIF** *mediana d'intensitat de fluorescència*

**MZ** *Limfòcits B de la zona marginal*

**NK** *natural killer*

**NOD** *Non-Obese Diabetic*

**PALS** *Periarteriolar lymphoid sheath*

**RAG** *Recombination Activating Genes*

**Sp** *Substancia P*

**SPF** *Specific pathogen free*

**T1** *Limfòcits B transicionals de tipus 1*

**T1D** *diabetis mellitus tipus 1 (Type 1 Diabetes )*

**T2** *Limfòcits B transicionals de tipus 2*

**T3** *Limfòcits B transicionals de tipus 3*

**TCR** *receptor de limfòcit T ( T-cell receptor)*

**TF** *tampó fosfat*

**TFM** *Tissue freezing medium*

**TLR** *toll like receptors*

**Treg** *Limfòcits T reguladors*

**TRPV1** *transient receptor potential  
vanilloid-1*

**UNG** Uracil-DNA glicosidasa

**VH** regió variable de la cadena pesada  
de la immunoglobulina

**VL** regió variable de la cadena  
lleugera de la immunoglobulina

**VNTR** *variable number of tandem  
repeats*

### III- INTRODUCCIÓ



El sistema immunitari té la funció fisiològica de defensar l'organisme davant l'entrada de microorganismes infecciosos i substàncies estranyes. No obstant això, a vegades, i a causa de diferents factors, el sistema immunitari detecta com estrany proteïnes de l'organisme i respon contra elles amb l'objectiu d'eliminar-les, de manera que la protecció que ofereix el sistema immunitari es gira en contra del mateix organisme.

La diabetis mellitus tipus 1 (T1D) és una malaltia autoimmunitària on les cèl·lules del sistema immunitari reconeixen proteïnes de les cèl·lules beta pancreàtiques i les ataquen. Com a conseqüència de l'atac, es produeix la mort de gran part de les cèl·lules beta pancreàtiques, que són les encarregades de la producció de la insulina. Quan la massa restant de cèl·lules beta pancreàtiques no és suficient per produir la insulina necessària per mantenir regulada la glicèmia, és quan apareix la manifestació clínica de la malaltia.

Tot i que les cèl·lules beta pancreàtiques són la diana més coneguda en el procés de diabetis autoimmune, també hi ha altres tipus cel·lulars que pateixen l'atac autoimmunitari en el decurs de la T1D. Aquestes cèl·lules, són les cèl·lules del sistema nerviós perifèric responsables de la innervació dels illots pancreàtics. Les cèl·lules nervioses comparteixen antígens amb les cèl·lules beta pancreàtiques, fet que les converteix també en diana de l'atac autoimmunitari.

En el treball que es presenta a continuació té com a objectiu endinsar-se en l'estudi de la resposta contra les cèl·lules nervioses en el decurs de la diabetis tipus 1. Concretament, en el paper dut a terme pels limfòcits B contra la periferina, proteïna present en aquestes cèl·lules nervioses, i identificada com a autoantigen reconegut pels limfòcits B.

## 1.-Limfòcits B

Els limfòcits B formen part dels leucòcits o cèl·lules blanques de la sang. La seva funció és la producció d'anticossos, tot i això, també tenen un paper rellevant com a cèl·lules presentadores d'antigen amb capacitat d'activar els limfòcits T, i com a cèl·lules reguladores amb, capacitat de modular la resposta immunitària. Diversos estudis han descrit la participació dels limfòcits B en moltes malalties autoimmunitàries, entre les quals hi ha la diabetis mellitus tipus 1.



## **1.1. Desenvolupament dels limfòcits B**

En humans, així com en la resta de mamífers, els limfòcits B es generen al fetge durant el desenvolupament fetal, i a la medul·la òssia a partir del naixement<sup>1</sup>.

En el desenvolupament dels limfòcits B es poden distingir diferents etapes, separades entre elles en l'espai i el temps. La primera etapa és la generació dels limfòcits B immadurs que té lloc a la medul·la òssia. La segona etapa de desenvolupament dels limfòcits va des que els limfòcits B immadurs abandonen la medul·la òssia, fins que maduren als òrgans limfocitaris secundaris. Finalment, l'última etapa s'inicia amb l'activació dels limfòcits B que té lloc quan aquests es troben circulant pels diferents òrgans limfocitaris secundaris i reconeixen l'antigen.

A causa de la unió específica del receptor dels limfòcits B amb l'antigen, aquests es transformen en cèl·lules efectores, i adopten un fenotip de cèl·lules plasmàtiques o de cèl·lules B memòria amb la funció d'activar-se en una posterior trobada amb l'antigen<sup>2</sup>.

A continuació s'expliquen amb més profunditat cada una de les etapes del desenvolupament dels limfòcits B.

### **1.1.1. Primera etapa: Desenvolupament dels limfòcits B a medul·la òssia**

El desenvolupament dels limfòcits B comença a partir de la diferenciació de les cèl·lules mare hematopoètiques (HSC, de l'anglès *hematopoietic stem cells*) cap a un progenitor limfoide comú (CLP, de l'anglès *common lymphoid progenitor*). Aquest progenitor donarà diferents llinatges limfocitaris, entre els quals hi ha els limfòcits T, les cèl·lules *natural killer* (NK) i els limfòcits B<sup>3</sup>.

La diferenciació cap a limfòcits B ve marcada per l'expressió en membrana de la isoforma B220 de la molècula CD45 i el marcador AA4.1. (CD93). La molècula B220/CD45 també es pot trobar expressada en cèl·lules NK<sup>4</sup>. Durant la fase de desenvolupament dels limfòcits B és clau la presència de la interleucina 7 (IL-7) i la quimiocina CXCL12, ambdues produïdes per les cèl·lules que conformen l'estroma de la medul·la òssia. Aquestes citoquines són essencials per la proliferació i maduració dels limfòcits B<sup>5</sup>. A mesura que els limfòcits avancen en l'etapa madurativa la seva dependència en aquests mediadors és menor.

A medul·la òssia és on té lloc l'expressió del primer receptor de les cèl·lules B (BCR, de l'anglès *B-cell receptor*). Aquesta expressió es realitza en dues etapes. En un primer moment, es reordena la cadena pesada de la immunoglobulina M (IgM) (fase pro-B), i s'expressa a la superfície cel·lular en un complex creat amb la cadena "invariant" substitutiva de la cadena lleugera<sup>6</sup>, i les molècules Igα i Igβ<sup>7</sup>,

creant així un complex pre-BCR (fase pre-B) que proporciona a la cèl·lula senyals de supervivència. Si la reordenació de la cadena pesada fos incorrecte, no es transmetria el senyal i la cèl·lula entraria en apoptosi. Aquí es troba un dels primers punts de control de la maduració dels limfòcits B<sup>8</sup>. La segona etapa d'expressió del BCR és la reordenació de la cadena lleugera. En aquest estadi els limfòcits B ja expressen el BCR complet a la seva superfície cel·lular i es converteixen en limfòcits B immadurs. A partir d'aquest punt els limfòcits immadurs surten de la medul·la òssia i segueixen la seva maduració a la perifèria. No obstant això, es calcula que només un 10% dels limfòcits immadurs abandonarà la medul·la, a causa de l'eliminació dels limfòcits B autoreactius<sup>9</sup>. En aquest fet s'entrarà en detall més endavant. És important senyalar que en aquest període ocorriria un fenomen anomenat "exclusió al·lèlica". Es tracta del bloqueig de l'expressió dels al·lels dels gens de les immunoglobulines (Igs) quan finalment s'expressa a la superfície de la cèl·lula un BCR funcional<sup>10</sup>.

### ***1.1.2. Segona fase: Desenvolupament fora de la medul·la òssia.***

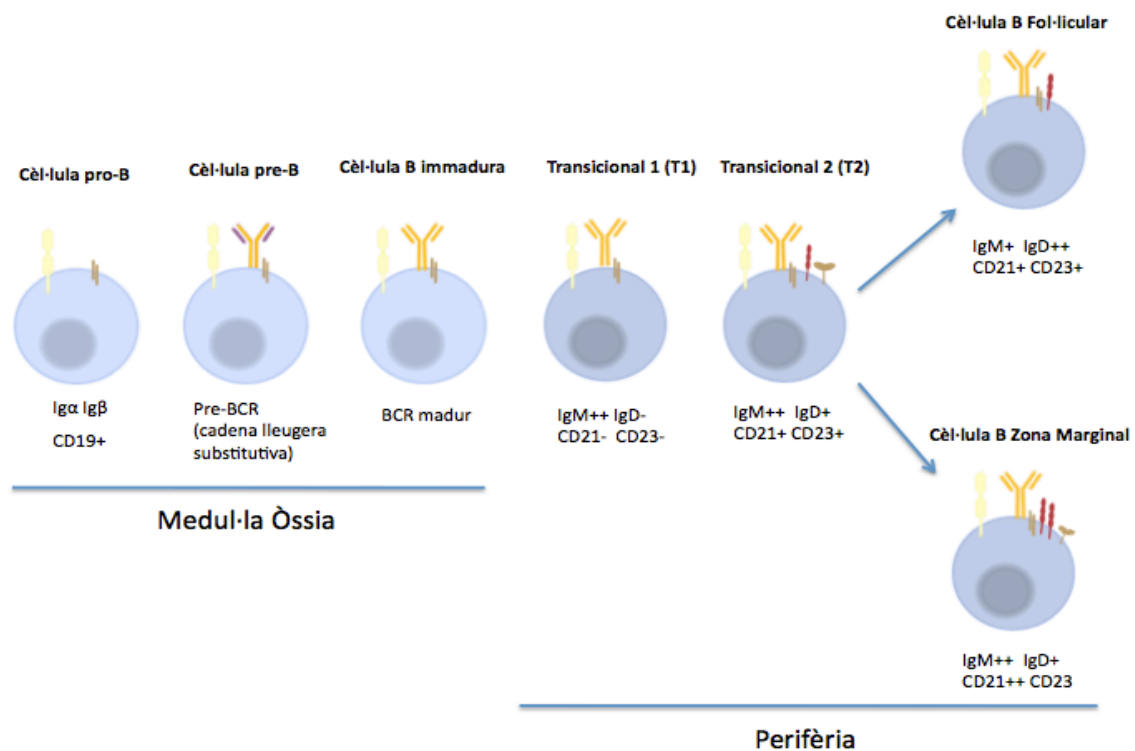
Després de sortir de la medul·la òssia, els limfòcits B immadurs migren cap a la melsa, on té lloc la seva maduració. Abans d'assolir la maduració final, els limfòcits passen per estadis intermedis anomenats transicionals. La maduració conclou amb una baixada d'expressió de CD24 i IgM, i un augment d'expressió de la molècula CD62L, la qual permet als limfòcits B recircular per la perifèria a la recerca de la interacció amb l'antigen<sup>11</sup>.

En el primer estadi, les cèl·lules procedents de la medul·la migren a la melsa i se situen a la zona de la polpa blanca, el que es coneix com a PALS (de l'anglès *Periarteriolar lymphoid sheath*). Aquestes cèl·lules només expressen IgM a la seva superfície (CD23-, CD21-) i se les coneix com a cèl·lules transicionals de tipus 1 (T1). A mesura que avancen en el procés maduratiu, es desplacen als fol·licles limfoides. La migració a fol·licles es porta a terme mitjançant l'expressió de CXCR5 a la superfície cel·lular. L'expressió de CXCR5 i altres molècules, com són IgD, CD21 i CD23, determina el canvi a cèl·lules transicionals de tipus 2 (T2)<sup>12</sup>. S'ha descrit un tercer tipus de cèl·lules transicionals anomenades transicionals de tipus 3 (T3). Les T3 comparteix semblances fenotípiques amb les T2, però presenten nivells més baixos d'expressió de IgM a la seva superfície. No obstant això, avui en dia encara està en discussió si formen part de l'etapa madurativa o són limfòcits B que han adoptat un estat anèrgic<sup>13</sup>.

No es coneix del tot quins són elements generats en el microambient de la melsa que afavoreixen la maduració dels limfòcits. En els darrers anys, s'ha posat en relleu el paper de la molècula BAFF (de l'anglès *B-cell activating factor belonging to the TNF family*) i el seu homòleg APRIL (de l'anglès *A proliferation inducing ligand*) com a factors essencials per a la supervivència dels limfòcits B<sup>9,14</sup>. S'ha descrit que

el receptor de BAFF, juntament amb un BCR funcional, és crucial per a la maduració dels limfòcits B<sup>15</sup>. De manera que els animals deficients en el receptor de BAFF tenen gairebé una manca total de limfòcits B madurs a la perifèria, ja que la majoria es troben aturats en l'estadi T1<sup>16</sup>. No obstant això, la presència de BAFF no és essencial per a la supervivència i desenvolupament dels limfòcits B1, ja que s'ha descrit que en absència de BAFF la subpoblació de limfòcits B1 poden madurar amb normalitat<sup>17</sup>.

Com s'ha comentat anteriorment, la presència del BCR funcional és essencial per la supervivència dels limfòcits B. A més, la senyalització a través del BCR marca el destí maduratiu dels limfòcits B cap a les diferents subpoblacions. S'ha postulat que una senyalització forta a través del BCR afavoreix la formació de la població B1, mentre que un senyal més dèbil afavoreix la formació de B2 (limfòcits B fol·liculars i de zona marginal). Concretament, un senyal intermedi afavoreix la formació de limfòcits B fol·liculars (FO) i una senyalització dèbil originaria la població de limfòcits B de zona marginal (MZ)<sup>9</sup>. Tot i que el BCR és la molècula central de senyalització, hi ha altres molècules que intervenen modulant el senyal<sup>18</sup>. Molècules com el CD19, CD21 i CD81 actuen activant el senyal<sup>19</sup>, mentre que les molècules CD22 i CD45 l'inhibeixen<sup>20</sup>.



**Figura 1.-** Estadis del desenvolupament en la medul·la òssia i en la perifèria (melsa) dels limfòcits B convencionals o B2. S'indiquen els marcadors de diferenciació (CD de l'anglès cluster of differentiation) expressats a la superfície cel·lular així com el nivell d'expressió de les immunoglobulines en cada etapa (adaptat de Almqvist et al.)<sup>6</sup>.

## **1.2. Activació dels limfòcits B**

Un cop els limfòcits B han adquirit el seu fenotip de cèl·lules madures, el següent pas és esdevenir cèl·lules efectores. Entre les cèl·lules efectores es diferencien les cèl·lules plasmàtiques productores d'anticossos i les cèl·lules memòria. El pas de limfòcit B naïf (un limfòcit B que no ha estat en contacte amb l'antigen) a cèl·lula efectora té lloc quan el receptor del limfòcit B rep una estimulació antigènica, és a dir, reconeix de forma específica l'antigen<sup>21</sup>.

En funció de la naturalesa de l'antigen seguirà una via d'activació T-dependent o T-independent. L'activació T independent es produeix quan el limfòcit B reconeix antigens lipídics o polisacàridics, compostos per dominis antigènics equivalents és a dir, de múltiples epítops, hi ha un reclutament de diverses Igs de membrana que actuen alhora amb l'antigen, fenomen anomenat "*cross linking*". La interacció d'aquestes Igs<sup>22</sup>, juntament amb altres molècules coestimuladores, és suficient per transmetre el senyal i generar una resposta contra l'antigen<sup>23</sup>.

En canvi, quan els limfòcits B reconeixen un antigen proteic, compost per un únic determinant antigènic, aquests endociten l'antigen, el processen i el presenten a la seva superfície en forma de pèptids ancorats a la molècula de molècules d'histocompatibilitat principal (MHC, de l'anglès *Major Histocompatibility Complex*)<sup>24</sup>. És en aquest context que els limfòcits CD4 a través del seu receptor de limfòcits T (TCR, de l'anglès, *T-cell receptor*) reconeixen l'antigen, i a través de les molècules coestimuladores (segon senyal) i l'alliberació de citokines (tercer senyal), promouen l'activació dels limfòcits B, transformant-se aquestes en cèl·lules efectores. És per això que aquesta via d'activació es coneix com a T-depenent<sup>25</sup>.

### **1.2.1. Activació de manera T- dependent**

L'activació depenent de limfòcits T efecta a la subpoblació de limfòcits B fol·liculars (CD21+, IgM+, IgD+)<sup>1</sup>. Per tal que es porti a terme l'activació, és necessari que primer els limfòcits B i T entrin en contacte amb l'antigen, de manera independent. En el cas dels limfòcits T CD4, l'antigen els serà presentat per cèl·lules dendrítiques en el context de MHC de classe II, de manera que passaran a ser limfòcits T CD4 activats<sup>25</sup>.

Per la seva banda, l'activació dels limfòcits B també requereix el contacte amb l'antigen. Actualment, encara està en discussió la via per la qual els limfòcits B entrarien en contacte amb l'antigen. S'ha postulat que el contacte amb l'antigen soluble podria tenir lloc als fol·licles limfoides o al torrent sanguini quan els limfòcits B estan migrant<sup>26</sup>. Una altra via de contacte possible de reconeixement antigènic és a través d'altres cèl·lules. Els limfòcits B podrien reconèixer l'antigen

en un estat natiu, a la superfície cel·lular de les cèl·lules dendrítiques<sup>27</sup>, cèl·lules fol·liculars dendrítiques<sup>28</sup> o macròfags<sup>29</sup> en els fol·licles limfoides, o adjacents d'aquests<sup>21</sup>.

Un cop realitzat el contacte de l'antigen amb el limfòcit B, comencen els primers senyals d'activació. El BCR per si sol no pot induir senyal a l'interior del citoplasma, ja que no expressa cap domini intracel·lular. És per això que és necessària la presència de les proteïnes Ig $\alpha$  i Ig $\beta$  que es troben associades als complexos del BCR. Aquestes proteïnes presenten uns dominis ITAMS (de l'anglès, *immunoreceptor tyrosine based activation motif*) rics en tirosines que permeten la senyalització intracel·lular<sup>30,31</sup>.

Com a conseqüència de la cascada de senyalització, el limfòcit B internalitzarà l'antigen unit al receptor i el processarà per tal d'expressar-lo a la seva superfície, en forma de pèptids ancorats a les molècules MHC de classe II. A la superfície del limfòcit B també s'expressaran molècules coestimuladores i receptors de quimiocines (CCR7) que propiciaran la interacció amb els limfòcits T<sup>32,33</sup>.

Un cop s'ha realitzat la trobada amb l'antigen per part dels limfòcits B i T, ambdós migren a la zona B-T del gangli limfàtic (la regió que separa el còrtex del gangli, poblada de limfòcits B, del paracortex, regió poblada de limfòcits T)<sup>34</sup>. Allà és on tindrà lloc la interacció antigen-específica dels limfòcits T i B. En aquesta interacció hi haurà una activació mútua, que és el que es coneix com el segon senyal. Senyal necessari per a què el limfòcit B esdevingui cèl·lula efectora i mediada per la interacció CD40 amb CD40L<sup>35</sup>.

La interacció antigen-específica té lloc a través del TCR i el complex MHC, a on s'hi troba l'antigen processat com a pèptid. A més de la unió amb el TCR, també hi ha interacció entre el CD28 expressat a la superfície dels limfòcits T i les molècules coestimuladores B7 (CD80, CD86) presents a la superfície dels limfòcits B<sup>36</sup>. A causa de la interacció, els limfòcits T activats augmenten l'expressió de CD40L i la producció de citokines com són IL-21, IL-4, IL-2 i INF- $\gamma$  (tercer senyal)<sup>37</sup>.

Aquests factors portaran a l'activació completa dels limfòcits B. Fruit d'aquesta activació hi haurà una proliferació inicial dels limfòcits B formant el "focus primari". Posteriorment, alguns dels limfòcits B migraran del focus primari als fol·licles limfoides, on portaran a terme la reacció del centre germinal<sup>25</sup>.

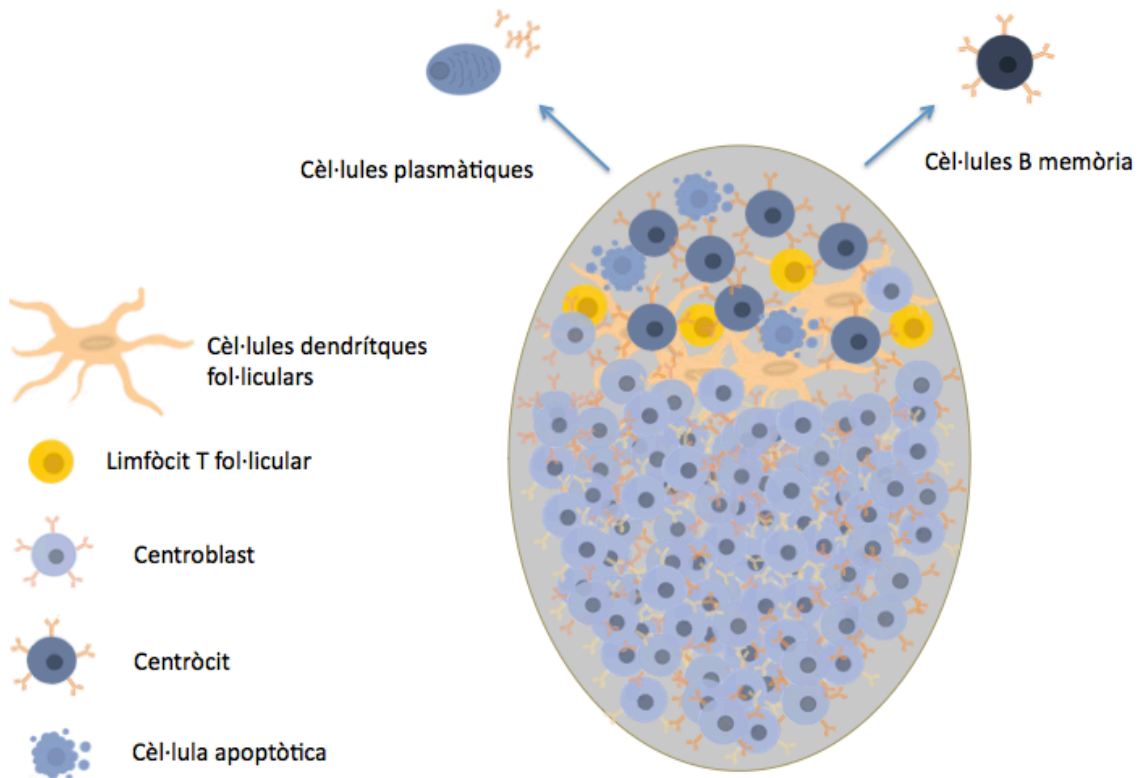
1.2.1.1. Formació del centre germinal

Els fol·licles estan formats principalment per limfòcits B. No obstant això, també s'hi troben, en menor mesura, altres tipus cel·lulars. Les cèl·lules fol·liculars dendrítiques són clau per les reaccions que es duen a terme en els centres germinals<sup>38</sup>. Aquestes cèl·lules són d'origen fibroblàstic i presenten receptors del complement (CD21) que els permet retenir a la seva superfície antígens units a immunocomplexos o a molècules del complement<sup>28</sup> és a dir el que s'anomena "icosomes". A més, aquestes cèl·lules afavoreixen la proliferació dels limfòcits B mitjançant l'alliberació de senyals de proliferació, i alhora faciliten l'eliminació dels limfòcits B apoptòtics mitjançant l'alliberació de la molècula Mfge8<sup>39</sup>.

Com hem comentat, els limfòcits B, acompanyats dels limfòcits T, migren des de la zona d'interacció T-B als fol·licles limfoides primaris annexos, a on es generen els centres germinals. En els centres germinals és a on finalment els limfòcits B es diferencien en cèl·lules plasmàtiques o cèl·lules de memòria<sup>32</sup>. Per tal d'assolir aquest fenotip, els limfòcits B s'expandeixen clonalment, pateixen mutacions somàtiques que els permeten madurar l'afinitat amb l'antigen i canviar l'isotip<sup>40</sup>. A causa de les divisions successives dels limfòcits B, els limfòcits que conformen el fol·licle es desplacen a la zona apical, creant així l'estructura del mantell. D'aquesta manera es transforma el fol·licle limfoide primari en fol·licle limfoide secundari. Les cèl·lules en divisió s'anomenen centroblasts, a mesura que es van dividint creen una zona fosca situada a la part basal del fol·licle. Amb les diferents divisions, alguns dels limfòcits deixen de proliferar i es converteixen en centròcits. Els centròcits es desplacen a la zona apical (zona clara) a on entren en contacte les cèl·lules fol·liculars dendrítiques i amb els limfòcits T<sup>41,42</sup>.

La organització de les dues zones del centre germinal ve regulada per l'acció de les quimiocines. De manera que a la zona fosca es produeix CXCL12, que s'uneix a CXCR4, receptor expressat a la membrana dels centroblasts. En canvi, els centròcits expressen el receptor CXCR5 que reconeix la quimocina CXCL13, expressada a la zona clara<sup>43</sup>.

Per tal que els centròcits esdevinguin cèl·lules memòria o plasmàtiques, és necessària la maduració d'afinitat del receptor dels limfòcits B i el canvi d'isotip<sup>44</sup>. També és necessària la interacció amb les cèl·lules fol·liculars dendrítiques i els limfòcits T col·laboradors presents a la zona clara<sup>25</sup>.



**Figura 2.-** Diagrama esquemàtic dels processos que tenen lloc durant la reacció del centre germinal. Alguns limfòcits B, després de ser activats per les cèl·lules T col·laboradors a la zona perifèrica del fol·licle limfoide, migren de nou a l'interior del fol·licle i proliferen, formant una zona fosca, amb elevada densitat cel·lular. En aquestes cèl·lules es produeixen hipermutacions en les regions variables de les immunoglobulines. Després de la migració dels limfòcits a la zona clara del centre germinal, on es troben cèl·lules dendrítiques fol·liculars i limfòcits T fol·liculars, es produeix una selecció d'aquells limfòcits B que presenten un BCR amb millor afinitat. Després del canvi d'isotip, els limfòcits es diferencien en cèl·lules memòria o cèl·lules productores d'anticossos (Adaptat de Gatto et al. 2010)<sup>25</sup>.

### 1.2.1.2. Maduració de l'afinitat

La primera resposta dels limfòcits B enfront l'antigen es caracteritza per la producció de IgM amb poca afinitat per l'antigen. Quan els limfòcits B s'expandeixen als centres germinals, també maduren l'afinitat del seu BCR enfront l'antigen<sup>45</sup>. És un procés depenent de l'antigen i dels limfòcits T fol·liculars. No obstant això, també s'ha descrit en cèl·lules de la zona marginal una maduració d'afinitat independent dels limfòcits T<sup>46</sup>.

La maduració de l'afinitat dels anticossos s'aconsegueix introduint mutacions (hipermutació somàtica) en les regions variables de les immunoglobulines. La taxa

de mutació és sis ordres de magnitud major que les mutacions espontànies, i es concentren en regions concretes anomenades "hotspot"<sup>47</sup>.

Existeixen dos tipus de mutacions, les transaccionals a on es canvia un nucleòtid de la mateixa estructura. És a dir, es canvia una purina per una altra purina (A/G) o una pirimidina per una altra pirimidina (C/T), i les mutacions transversionals a on les purines són substituïdes per pirimidines i viceversa.

Durant la hipermutació somàtica l'enzim AID (de l'anglès, *activation induced cytidine deaminase*) és l'encarregat d'introduir els canvis al DNA. També s'ha descrit la implicació d'aquesta proteïna en el canvi d'isotip<sup>48</sup>. L'acció de L'AID recau sobre el DNA de cadena simple. L'AID produeix la desaminació d'una citocina que es converteix en uracil (U). L'Uracil pot ser reconegut com a timidina en les diferents replicacions de DNA. De manera que part de les cèl·lules resultants incorporaran la mutació A/T, mentre que la resta mantindran la seqüència original C/G<sup>49</sup>.

Una altra via de canvi nucleotídic ve donada per la participació d'Uracil-DNA glicosidasa (UNG). Després de l'acció de AID, UNG reconeix l'Uracil originat i l'elimina. D'aquesta manera, durant el procés de replicació la polimerasa pot introduir qualsevol dels nucleòtids<sup>49</sup>.

Finalment, el mecanisme pel qual apareixeria la mutació A/T s'explicaria gràcies a l'acció de la polimerasa *pol η*<sup>50</sup>. Després de l'acció de AID, l'alteració és reconeguda i eliminada mitjançant l'exonucleasa I, que elimina també part de la cadena afectada. Quan es realitza la repolimerització, la *pol η* introdueix errors en la seqüència, a causa de la seva baixa fidelitat de còpia. Aquests errors són més acusats a l'hora d'aparellar el nucleòtid A, de manera que el pot aparellar amb qualsevol dels nucleòtids disponibles<sup>51</sup>.

Un cop realitzada la maduració d'afinitat, els limfòcits B es dirigeixen a la zona clara on interaccionen amb els limfòcits T i les cèl·lules fol·liculars dendrítiques. Allà reben senyals que permetran als limfòcits B amb un BCR amb més afinitat per l'antigen proliferar, mentre que els que presentin un BCR amb poca afinitat els induiran a la mort per apoptosi<sup>52</sup>, o tornaran a la zona fosca on es generarà una revisió dels receptors<sup>53</sup>.

Els limfòcits B seleccionats de manera positiva per l'antigen podran abandonar el centre germinal i convertir-se en cèl·lules plasmàtiques o de memòria, o tornar a la zona fosca a on es tornaran a dividir i hi haurà una revisió del seu receptor<sup>25</sup>.



### 1.2.1.3. Canvi d'isotip de la immunoglobulina

En els estadis més primerencs de la maduració, el limfòcit B expressa immunoglobulines de l'isotip IgM i IgD a la seva superfície<sup>12</sup>. Durant el procés d'activació del limfòcit, i mitjançant l'acció de l'enzim AID, es porta a terme el canvi d'isotip<sup>48</sup>. En aquest procés es manté l'especificitat antigènica de la immunoglobulina, però se'n varia l'isotip de la cadena pesada. De manera que s'originen immunoglobulines de l'isotip IgG, IgA o IgE, cada una d'elles involucrades en diferents funcions<sup>54, 55</sup>.

El procés del canvi d'isotip està relacionat amb l'activació per part dels limfòcits T, concretament a través del seu lligand de CD40, el CD40L<sup>56</sup>. Recentment s'ha descrit que la senyalització a través de BAFF i el seu homòleg APRIL, per part de les cèl·lules dendrítiques, també podria activar el canvi d'isotip de manera T-independent<sup>57</sup>.

També cal destacar la influència de les citoquines i dels receptors TLR (de l'anglès, *toll like receptors*) en el canvi d'isotip. La presència de determinades citoquines, juntament amb l'estímul a través dels TLRs afavorirà un isotip o un altre. De manera que l'activació del TLR9, el TLR7 o el TLR4 i la presència de IL-4 en el medi propiciarà el canvi a immunoglobulines del tipus IgG1 en ratolins, en humans IgG4 i IgE<sup>56,58</sup>. En canvi, si al medi hi ha presència de INF- $\alpha$  o TGF- $\beta$  induirà el canvi a IgG2a o IgA, respectivament<sup>58</sup>.

### 1.2.1.4. Cèl·lules plasmàtiques

Les cèl·lules plasmàtiques es caracteritzen per la capacitat de produir i secretar anticossos. S'ha calculat que cada segon una cèl·lula plasmàtica produeix 2000 anticossos. Dintre les cèl·lules plasmàtiques es diferencien les cèl·lules de vida mitjana curta i les de vida mitjana llarga. Ambdues poblacions presenten el marcador CD138 a la seva superfície, però no els marcadors típics de limfòcits B com són CD19 i B220. També s'ha descrit la presència del factor de transcripció Blimp1 i interleuquines, com són IL-4 i IL-21, necessaris per a la diferenciació i supervivència de les cèl·lules plasmàtiques<sup>58</sup>.

No es coneix el mecanisme que determina un o altre subtipus. Es coneix que les reaccions del centre germinal i el pas a cèl·lules memòria és necessari per esdevenir cèl·lules plasmàtiques de llarga vida<sup>59</sup>. Un cop generades al centre germinal, aquestes cèl·lules abandonen el fol·licle gràcies a l'acció del lligand del receptor CXCR4, expressat a la seva superfície. El lligand del receptor CXCR4 s'expressa en els cordons medul·lars dels ganglis, a la polpa roja de la melsa i en

cèl·lules estromals de la medul·la òssia. Aquest últim s'ha descrit com un important reservori de cèl·lules plasmàtiques de vida llarga paper<sup>60</sup>.

#### 1.2.1.5. Cèl·lules memòria

Després de la maduració d'afinitat, alguns limfòcits B activats es transformen en cèl·lules memòria. No es coneix el mecanisme pel qual això passa. Aquestes cèl·lules es generen als centres germinals i resten als òrgans limfoides. Es caracteritzen per ser cèl·lules que poden viure llargs períodes sense proliferar, no obstant això, davant una nova trobada amb l'antigen organitzen una resposta ràpida<sup>32,52</sup>.

#### **1.2.2. Activació de manera T- independent**

L'activació dels limfòcits B de manera independent a l'acció dels limfòcits T, és característica de les cèl·lules de la zona marginal i de les cèl·lules B1. Aquests limfòcits entren amb contacte amb l'antigen quan és presentat a través dels macròfags<sup>1</sup>. Els macròfags tenen la capacitat de capturar bacteris i altres antígens particulats que es troben en circulació pels vasos sanguinis, i estimular els limfòcits que es troben a la zona marginal, de fenotip CD21+, CD23+, IgM+, IgD<sup>low</sup><sup>61</sup>.

L'activació T-independent dels limfòcits de la zona marginal permet la transformació d'aquestes cèl·lules cap a cèl·lules productores d'anticossos naturals o cèl·lules presentadores d'antigen amb capacitat d'activar els limfòcits T CD4. Són capaces de generar respostes intenses i duradora en una segona exposició amb l'antigen, resposta característica dels limfòcits de memòria, encara que aquestes cèl·lules presenten canvis d'isotip i maduració d'afinitat molt limitats<sup>23</sup>.

Aquesta població es caracteritza per respondre, principalment, contra patògens que presenten a la seva superfície antígens amb determinants antigènics repetits, com són virus i bacteris encapsulats. Una de les característiques d'aquesta població és la polireactivitat que presenten els seus BCR, però tot i aquesta polireactivitat, presenten nivells baixos d'autoimmunitat<sup>62</sup>.

La unió del BCR amb els antígens compostos per múltiples epítops antigènics idèntics, provoca l'agrupació de diferents immunoglobulines (*cross-linking*), que causen l'activació del limfòcit B sense la mediació dels limfòcits T<sup>63</sup>.

A més de la unió amb de l'antigen amb el BCR, l'activació originada és a causa, en part, per la presència de receptors TLR presents a la superfície dels limfòcits B que

reconeixen lligands bacterians i proporcionen el segon senyal necessari per l'activació dels limfòcits B<sup>64</sup>. L'activació del complement per part de polisacàrids, i la senyalització mitjançant BAFF fruit de la interacció amb cèl·lules dendrítiques o macròfags, també podria donar com a resultat el segon senyal necessari per a l'activació de manera T-independent dels limfòcits de la zona marginal<sup>65</sup>.

A més de ser la primera línia de defensa davant l'entrada de patògens a l'organisme, les cèl·lules de la zona marginal presenten altres funcions, entre les quals destaca l'activació dels limfòcits CD4. S'ha descrit que les cèl·lules de la zona marginal, a diferència de les cèl·lules fol·liculars, poden activar els limfòcits CD4 naïf i conduir-los cap a un fenotip efector<sup>16</sup>. També s'ha descrit la capacitat d'aquests limfòcits B per transportar antígens, tant T-dependents com T-independents, a la seva superfície mitjançant immunocomplexos, i dipositar-los a les cèl·lules fol·liculars dendrítiques<sup>66</sup>, fet necessari per a la generació de la resposta T-depenent.

#### 1.2.2.1. Cèl·lules B1

Les cèl·lules B1, igual que els limfòcits B de zona marginal, tenen la capacitat de generar una resposta T-independent i produir anticossos naturals, els qual es troben presents en circulació sense que s'hagi produït un contacte amb l'antigen<sup>67</sup>. És per això, juntament amb la capacitat de ser activats quan entren en contacte amb determinats patògens, que es situa la població B1 en una posició intermèdia entre la immunitat innata i la immunitat adaptativa.

Els limfòcits B1 es troben principalment la cavitat peritoneal i pleural, tot i això, també són presents als òrgans limfocitaris secundaris i en circulació, però en un nombre més reduït<sup>68</sup>. La generació d'aquestes cèl·lules és un tema que, actualment, encara es troba en discussió. Hi ha diferents hipòtesis que explicarien la generació dels limfòcits B1. D'una banda es troba la hipòtesi que postula que la població B1 tindria un origen diferent de les B2, de manera que es generarien al feto fetal i es mantindrien gràcies a la seva capacitat d'autorenovació<sup>66</sup>.

Per altra banda, una altra hipòtesi defensa que la unió forta del BCR amb un antigen, en els limfòcits immadurs, donaria lloc als limfòcits B1<sup>9</sup>. Finalment trobem grups que suggereixen que ambdues hipòtesis podrien coexistir, de manera que l'origen limfocitari seria diferent, però una senyalització intensa pel BCR també seria requerida per la generació d'aquesta subpoblació. En humans no s'ha descrit aquesta subpoblació, i per aquest motiu es creu que la seva funció seria portada a terme per limfòcits B de memòria de la zona marginal<sup>18</sup>.

Els limfòcits B1 són CD19+, IgM++, IgD-, CD23-, CD21- i CD43+. En funció de l'expressió de la molècula CD5 es cataloguen com a B1a, si l'expressen a la seva superfície, o B1b, si no l'expressen. Els limfòcits B1 presents a la cavitat peritoneal i pleural presenten a la seva superfície CD11b, mentre que els d'origen esplènic no l'expressen<sup>66</sup>.

### **1.2.3. Limfòcits B reguladors**

Entre les diferents poblacions de limfòcits B hi ha un grup heterogeni compost de diverses subpoblacions que regulen la resposta immunològica. Tot i estar format per un grup de limfòcits B de diferents orígens, tots els limfòcits B reguladors comparteixen la mateixa funció, la supressió de la resposta immunològica. En estudis realitzats s'ha observat que limfòcits B1-a, limfòcits de la zona marginal o limfòcits T2 precursors de la zona marginal (T2-MZ) poden dur a terme la funció supressora. Pel que fa a les pròpiament dites cèl·lules B reguladores o B10 representen entorn de l'1-2% de cèl·lules totals de la melsa<sup>69</sup>, i es caracteritzen per l'expressió dels marcadors CD19, CD5 i CD1d+ a la seva membrana cel·lular, i per la secreció de IL-10, igual que la resta de limfòcits B d'altres orígens amb acció supressora<sup>70</sup>.

Es creu que l'activació de les cèl·lules reguladores pot ser duta a terme mitjançant la senyalització endògena, a través del lligand del CD40, o exògena, a través de la senyalització per TLRs. S'ha descrit que l'activació a través del TLR4 i TLR9 propicien la producció de IL-10. No obstant això, s'ha descrit la presència de B10 en models animals deficients per Myd88, molècula present a la via de senyalització dels TLR<sup>71</sup>. També s'ha descrit la presència de limfòcits B reguladors en animals deficients per la molècula CD40, fet que fa pensar que aquestes molècules tenen tan sols un paper potenciador de la resposta. Mitjançant l'estudi de models animals s'ha vist que l'activació per reconeixement antigènic és crucial per induir la funció supressora, ja sigui per la unió directa amb la molècula del BCR o a través de la participació de la molècula co-receptora CD19<sup>72</sup>.

També gràcies a l'estudi dels models animals, s'ha descrit que els limfòcits B podrien tenir una funció reguladora en moltes malalties autoimmunitàries, ja que la supressió dels limfòcits B exacerba la malaltia en els models animals per a l'esclerosi múltiple (EAE)<sup>73</sup>, per al lupus eritematós sistèmic (LES)<sup>74</sup> i en model induït per a l'artritis reumatoide (CIA)<sup>75</sup>. En canvi, quan hi ha una depleció dels limfòcits B en la T1D s'observa un endarreriment de la malaltia i una baixada de la incidència en els models animals per diabetis<sup>76</sup>.

Actualment, hi ha molts estudis centrats en el paper dels limfòcits B reguladors en els trasplantaments. Molts indicis apunten que la supressió de la resposta

immunitària, portada a terme pels limfòcits B reguladors, evitaria la resposta en contra de l'empelt <sup>77,69</sup>.

### **1.3. El receptor dels limfòcits B**

L'activació dels limfòcits B té lloc després que el receptor dels limfòcits B, o BCR, entri en contacte amb l'antigen que reconeix. Aquesta interacció inicia una cascada de senyalització que induirà a la internalització de l'antigen i la presentació als limfòcits T<sup>78</sup>.

El receptor dels limfòcits B està compost per una molècula d'immunoglobulina expressada a la membrana cel·lular que es troba associada a les cadenes Igα i Igβ<sup>7</sup> i al complex del coreceptor, compost pel CD19, CD21 i CD81. La immunoglobulina reconeix l'antigen de forma específica, com que no presenta un domini transmembrana, es serveix de les molècules associades amb dominis ITAMs per transmetre la senyalització intracel·lular, i així activar la cascada de senyalització<sup>30</sup>.

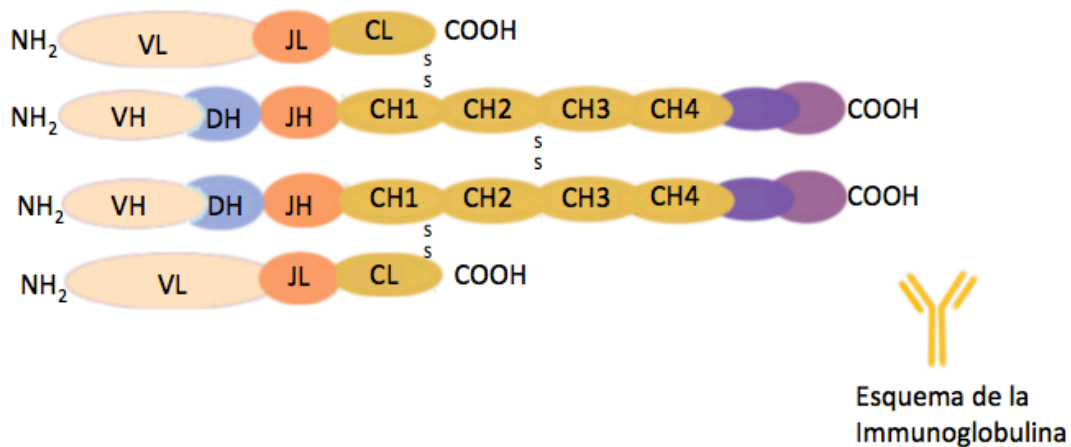
Les immunoglobulines són glicoproteïnes compostes per dues cadenes lleugeres idèntiques de 25 kDa i dues de pesades també idèntiques de 50kDa. Existeix un únic gen que codifica per a la cadena pesada situat al cromosoma 14, en canvi, hi ha dos gens per a la cadena lleugera que originen la cadena kappa i la cadena lambda, localitzats en el cromosoma 2 i 22, respectivament. En humans, ambdues cadenes es troben en una proporció semblant (60% la kappa i 40% la lambda), mentre que en ratolins predomina la cadena kappa, ja que és present entorn del 90% dels anticossos<sup>79</sup>. Els gens de les diferents cadenes estan compostos per sèries de diferents exons. En una primera instància, trobem una sèrie de 15 segments V (variable), seguit de 12-13 segments de D (diversitat)(només en el gen de la cadena pesada), 4 fragments J (de l'anglès *joining*), i finalment exons C (regió constant). La cadena pesada (H, de l'anglès *heavy*) es genera a partir de la unió de 4 segments (VH, D, JH i CH), en canvi, la cadena lleugera (L, de l'anglès *light*) es genera a partir de l'acoblament de 3 segments (VL, JL i CL)<sup>80,81</sup>.

Es coneix el procés de recombinació dels exons com a recombinació VDJ. Aquest procés es porta a terme en les etapes pro-B i pre-B del desenvolupament dels limfòcits B<sup>82</sup>. Durant la recombinació dels fragments es duen a terme una sèrie de reaccions de trencament i reparació del DNA catalitzades pels enzims RAG(de l'anglès, *recombination activating genes*)<sup>83</sup>.

Cada una de les cadenes presenta dues regions, una regió variable situada a l'extrem aminoterminal i una regió constant a l'extrem carboxiterminal. En el moment de l'acoblament, cada una de les cadenes lleugeres s'uneix covalentment a

una de les cadenes pesades, de manera que les regions variables de la cadena pesada (VH) i cadena lleugera (VL) queden juxtaposades. Les regions variables són les responsables del reconeixement antigènic, mentre que les regions constants tenen una funció efectora (Figura 3)<sup>82</sup>.

L'àmplia capacitat de reconeixement antigènic dels receptors del BCR, és el resultat de l'ordenació aleatòria dels fragments V(D)J de les cadenes de la immunoglobulina, juntament amb la maduració d'afinitat de les tres zones determinants de la complementarietat CDR<sup>84</sup>. És en aquestes zones on es produeix el reconeixement antigènic, i per tant, a on es produeixen les mutacions que aporten la maduració d'afinitat amb l'antigen.



**Figura 3.-** Estructura de la immunoglobulina de membrana IgM es mostren les regions variables de les cadenes pesades i lleugera, així com els punts d'unió, mitjançant ponts disulfur, entre les diferents cadenes (Adaptat de Tobón et. al. 2013)<sup>85</sup>.

Els limfòcits B tenen la capacitat de generar BCR pel reconeixement per un gran nombre d'antígens, no obstant això, a la superfície d'un limfòcit només s'expressen BCRs amb el mateix reconeixement antigènic, gràcies al fenomen d'exclusió al·lèlica. Els receptors dels limfòcits B poden conèixer quasi tots els tipus de molècules biològiques, com són lípids, hidrats de carboni i proteïnes. La unió del BCR amb la molècula que reconeix (l'antigen) és una unió reversible<sup>79</sup>.

Les immunoglobulines que conformen el receptor del BCR es poden trobar ancorades a la superfície cel·lular o poden ser secretades. Les immunoglobulines secretades es denominen anticossos. Segons l'estructura de la regió constant de la cadena pesada, els anticossos es poden dividir en diferents classes (o isotips) que són designades com IgA, IgG, IgD, IgE i IgM<sup>84,55</sup>. A més, dintre d'alguns dels isotips

trobem subclasses, de manera que es presenten dos subtipus de IgA (IgA1 i IgA2)<sup>54</sup> i quatre subtipus de IgG (IgG1, IgG2, IgG3 i IgG4) en humans; en ratolins trobem subtipus de IgG amb diferent nomenclatura, encara que no totes les soques les expressen<sup>86</sup>.

Les immunoglobulines a membrana es troben en forma monomèrica, mentre que les formes secretades (anticossos) poden ser monomèriques o multimèriques en alguns dels isotips. De manera que les IgG, IgE i la IgD que es troben circulants sempre són monomèriques, en canvi la IgM secretada és pentamèrica<sup>67</sup>. La IgA circulant es troba en forma monomèrica, mentre que la secretada en forma dimèrica o trimèrica<sup>54</sup>.

### **1.3.1. Unió antígen-anticòs**

La seqüència de l'antigen reconeguda pels anticossos s'anomena epítop o determinant antigènic. Els anticossos presenten una alta especificitat que els permet distingir entre dos epítops que es diferencien en un únic aminoàcid.

Dintre els epítops reconeguts pels anticossos es poden agrupar en dos grups, lineals o conformationals. Els epítops lineals estan formats per una seqüència d'aminoàcids adjacents, que en la majoria de casos, només apareix quan la proteïna es troba desnaturalitzada. Per altra banda, els epítops conformationals només són reconeguts quan la proteïna es troba en la seva conformació nativa, a diferència dels receptors dels limfòcits T (TCR), que només poden reconèixer antígens presentats com a pèptids en el context de les molècules de MHC<sup>79</sup>.

Un antígen pot presentar un o més epitops. Els antígens amb més d'un epítop (multivalent) afavoreixen el *cross linking* de les molècules del BCR que permet l'activació dels limfòcits B<sup>63</sup>. Tot i això, hi ha altres factors que influeixen en l'activació dels limfòcits B com són: quantitat d'antigen present al medi; l'estat en què es troba (soluble o ancorat a la membrana) i l'afinitat amb què l'anticòs reconeix l'antigen<sup>21,24</sup>. Tots aquests factors influeixen en el reconeixement antigènic. De manera que antígens monovalents, reconeguts amb alta afinitat per les immunoglobulines, poden generar un senyal suficientment fort com per al·lindar d'activació i desencadenar la cascada de senyalització<sup>87</sup>.

Després de l'activació causada pel reconeixement antigènic, els limfòcits B endociten el complex antígen-anticòs. Un cop endocitat, es fusiona amb diferents lisosomes i exosomes que contenen enzims i molècules MHC de classe II<sup>88</sup>. En aquests compartiments es digereix l'antigen en pèptids més petits<sup>89</sup>. Finalment, s'ancoren els pèptids a les molècules de MHC de classe II<sup>90</sup>, i surten a la superfície cel·lular, on són presentats als limfòcits T CD4<sup>36</sup>.

A la superfície cel·lular del limfòcit B, juntament amb les molècules de MHC de classe II, s'expressen molècules coestimuladores (CD80/CD86) que interaccionen amb receptors del limfòcit T (CD152 o CTLA-4, CD28) i afavoreixen la presentació antigènica dels pèptids<sup>91,92</sup>.

## **1.4. Tolerància i autoimmunitat en els limfòcits B**

El receptor dels limfòcits B, així com el receptor dels limfòcits T, es generen mitjançant la reordenació aleatòria, fet que els permet reconèixer pràcticament qualsevol molècula<sup>93</sup>. Dins aquestes molècules s'hi troben substàncies estranyes de l'organisme com proteïnes pròpies d'aquest. Per tal d'evitar el reconeixement i posterior resposta contra molècules del mateix organisme, els limfòcits T i B passen per diferents punts de regulació, de manera que es redueix la presència de limfòcits autorreactius a la perifèria. S'ha calculat que entorn del 20-50% de receptors dels limfòcits reconeixen estructures del mateix organisme, en canvi, només 3-8% de la gent pateix una malaltia autoimmunitària, fet que evidencia la gran regulació que es porta a terme en la majoria de nosaltres<sup>94</sup>.

Els mecanismes de tolerància són els encarregats de regular la presència de limfòcits B autorreactius. Es diferencien dos tipus de tolerància en funció de la seva localització anatòmica: la tolerància central, que té lloc a la medul·la òssia durant els primers estadis de desenvolupament dels limfòcits B; i la tolerància perifèrica, que té lloc als òrgans limfoides secundaris i regula els limfòcits B autoreactius que han escapat dels mecanismes de tolerància central<sup>95</sup>.

### **1.4.1. Tolerància central**

Durant el procés maduratiu dels limfòcits B, és necessari que els BCRs reconeguin amb baixa afinitat antígens presents a la medul·la òssia, per tal que puguin continuar avançant en la maduració. Aquest procés es coneix com a selecció positiva. En el cas que un limfòcit B reconegui un antígen propi amb alta afinitat, és quan entren en joc els mecanismes de la tolerància central per tal d'evitar la presència de limfòcits B autorreactius a la perifèria central<sup>95</sup>.

Dintre els mecanismes de la tolerància central que actuen a l'àmbit de medul·la òssia, s'hi troba: la deleció clonal, l'edició del receptor i l'anèrgia.

En un principi es va creure que el mecanisme més important en la tolerància central era la deleció dels limfòcits autorreactius, en canvi, actualment es coneix que el mecanisme principal és l'edició del receptor. Quan el limfòcit B autoreactiu reconeix una estructura pròpia de l'organisme amb alta afinitat, es produeix un



reordenament de la cadena lleugera del BCR. Amb el mateix objectiu també es pot reordenar el gen de l'al·lel de l'altra cadena lleugera. Aquest procés es porta a terme gràcies a l'acció dels gens RAG<sup>83</sup>.

Si la nova ordenació del BCR no reconeix cap estructura pròpia, el limfòcit pot seguir el seu procés maduratiu, però si pel contrari, la nova estructura del BCR segueix reconeixent amb alta afinitat estructures pròpies, el limfòcit B entraria en apoptosi<sup>94</sup>.

La inducció de l'apoptosi dels limfòcits B autorreactius és el mecanisme pel qual actua la selecció clonal. Quan un limfòcit B autorreactiu reconeix amb alta afinitat un antigen present a l'estroma medul·lar, s'inhibeix l'expressió de BAFF, factor de supervivència dels limfòcits B, a la vegada que té lloc un increment d'expressió de BIM, factor pro-apoptòtic<sup>95</sup>.

Ambdós processos tenen lloc quan l'antigen es troba particulat, per exemple a la membrana cel·lular. En canvi, quan l'antigen es troba de forma soluble, el limfòcit B immadur pot entrar en un estat d'anèrgia. L'anèrgia es caracteritza per la disminució de l'expressió del BCR de membrana i la incapacitat de respondre contra l'antigen quan se'l troba a la perifèria<sup>96</sup>.

#### ***1.4.2. Tolerància perifèrica***

A la perifèria, també existeixen mecanismes de control per tal d'evitar l'activació dels limfòcits B autoreactius que han evadit els mecanismes de tolerància de la medul·la òssia. Els principals mecanismes que es troben a la perifèria són la inducció d'anèrgia, la selecció clonal i la ignorància clonal.

Per tal d'activar els limfòcits B autoreactius, en la majoria de casos, és necessària la presència de l'antigen i el contacte amb els limfòcits T CD4 autoreactius pel mateix antigen. En el cas que la selecció dels limfòcits T s'hagi dut a terme correctament, els limfòcits B autorreactius no entraran amb contacte amb els limfòcits T col·laboradors, fet que no els permetrà rebre el segon senyal necessari per a l'activació, i entraran en un estat d'anèrgia<sup>96</sup>. També s'ha descrit que nivells alts de la molècula CD5 a la membrana cel·lular dels limfòcits B anèrgics són necessaris per mantenir la tolerància als antígens propis.

A més, s'ha descrit que els limfòcits anèrgics pateixen canvis d'expressió en els receptors de quimiocines que els impedeixen la migració a la zona T-B dels ganglis limfàtics, és el que es coneix com exclusió fol·licular<sup>97</sup>.

L'organisme presenta diferents àrees a on les cèl·lules del sistema immunitari no tenen accés, aquestes zones es coneixen com a zones "immunoprivilegiades". Entre

elles destaquen el sistema nerviós central, la cambra anterior de l'ull, els testicles, o en el cas de les dones embarassades, la gestació<sup>98</sup>. En aquestes zones té lloc el fenomen d'ignorància clonal, ja que els limfòcits B autoreactius no tenen accés a l'autoantigen<sup>99</sup>. La ignorància clonal també pot tenir lloc quan l'antigen es troba en molt baixa concentració, no suficient per a activar els limfòcits B autoreactius<sup>100</sup>.

#### **1.4.3. Autoimmunitat i limfòcits B**

Tot i els mecanismes de tolerància que regulen la presència de limfòcits B autoreactius, es pot detectar la presència d'autoanticossos a la perifèria, tant en individus que pateixen processos autoimmunitaris, com en individus que no els pateixen.

Una de les funcions més característiques dels limfòcits B és la producció d'anticossos<sup>101</sup>, no obstant això, en estudis realitzats amb pacients de malalties autoimmunitàries als quals se'ls ha deletat la població de limfòcits B, s'ha observat una millora de la malaltia, però no un canvi en els nivells d'anticossos al sèrum<sup>102</sup>. Aquest fet suggereix que l'acció dels limfòcits B en malalties autoimmunitàries seria un altre, ja sigui mitjançant l'acció de les citokines alliberades pels limfòcits B reguladors o com a cèl·lules activadores dels limfòcits T gràcies a la seva capacitat d'actuar com APCs<sup>103</sup>.

Mitjançant el tractament de pacients amb malalties autoimmunitàries amb Rituximab (anticòs anti-CD20), anticòs que deleta els limfòcits B, s'ha observat la implicació dels limfòcits B en nombroses malalties autoimmunitàries, com són l'artritis reumatoide<sup>75</sup>, LES<sup>104</sup>, T1D<sup>105</sup>, escleròsi múltiple<sup>106</sup> entre d'altres.

Per tal d'entendre millor quin és el paper dels limfòcits B en el decurs de les diferents malalties autoimmunitàries s'han generat diversos models animals.

##### 1.4.3.2. Models animals transgènics de gens de les immunoglobulines

El transgen, per definició, és una seqüència gènica que s'utilitza per modificar un organisme. La procedència d'aquest pot ser de la mateixa espècie o de diferent de la de l'organisme receptor. Aquesta tècnica va ser descrita el 1980 pel grup de Dr. Ruddle (Yale University, New Haven, USA), i consisteix en la microinjecció de la seqüència gènica en pronúclis d'oòcits<sup>107</sup>. En el camp de l'autoimmunitat s'han generat un gran nombre de models transgènics amb una varietat importat de transgens diferents. En aquest sentit alguns grups han desenvolupat nous models de ratolí, als quals han modificat el repertori dels limfòcits B mitjançant transgènesis, per tal de conèixer millor el paper dels limfòcits B en el decurs de les

malalties autoimmunitàries. De manera que es pot dir que els animals portadors del transgen pel receptor del limfòcit B són monoclonals pel que fa als limfòcits B, ja que en la majoria dels models s'ha descrit el fenomen d'exclusió al·lèlica dels gens endògens de les immunoglobulines<sup>10</sup>, a causa de l'expressió transgènica del BCR, fet es tradueix amb la presència d'un elevat nombre de limfòcits B que expressen el BCR transgènic. Això ha permès estudiar en detall els mecanismes implicats en la tolerància de limfòcits amb BCRs autoreactius, en diferents fons genètics, així com les característiques dels limfòcits B que l'expressen.

Dintre els models de transgènics pel receptor dels limfòcits B podem diferenciar dos grups diferents. Per una banda, els animals que expressen el BCR transgènic complet (cadena pesada i cadena lleugera), i per l'altra, els models que només expressen una de les dues cadenes de forma transgènica, de manera que aquesta es pot aparellar amb diferents cadenes d'origen endogen.

En la majoria de models a on s'insereix un BCR transgènic autoreactiu, es poden detectar diferents mecanismes de tolerància que influeixen en la funció i fenotip dels limfòcits B resultants. Així, bona part dels estudis els limfòcits B presenten un fenotip d'anergia, juntament amb una reducció en el nombre total de limfòcits B presents a la perifèria<sup>108,109</sup>. També s'ha observat, en alguns dels models, un segrest a diferents etapes del desenvolupament dels limfòcits B, fet que impossibilita la presència de cèl·lules madures<sup>110</sup>. El mecanisme d'anergització dels limfòcits B no és del tot conegut, no obstant això, es postula que la naturalesa de l'antigen, la via de presentació d'aquest, les interaccions amb el BCR (afinitat i avidesa), i el contacte prolongat amb l'antigen són claus pel desenvolupament dels limfòcits B anèrgics<sup>1</sup>. A la taula 1 es descriuen alguns dels models transgènics pel BCR, i les característiques fenotípiques que presenten. Alguns d'aquests models es descriuen i es discuteixen amb més profunditat a l'apartat de discussió d'aquesta memòria.

Model de ratolí	Especificitat antigènica	Bloqueig del desenvolupament	Temps de vida	Característiques
V <sub>H</sub> 125 x V <sub>K</sub> 125	Insulina	NO	Normal	No proliferen. Augment de la Zona Marginal. Desenvolupament normal de la T1D
MD4 X ML5	HEL	Estadi T3	Reduït	Disminució IgM i CD86. Localització zona T-B de melsa
V <sub>H</sub> 3H9 X V <sub>λ</sub> 2	dsDNA	Bloqueig en estadi immadurs	Reduït	Disminució CD80 i CD86 No proliferen, ni produeixen anticossos
V <sub>H</sub> 3H9 X V <sub>K</sub> 8	ssDNA	NO	Normal	No secreten anticossos
V <sub>H</sub> 2-12	ssDNA, Sm (Sm, smith antigen)	Pre-cèl·lules plasmàtiques	Normal /Reduït	No secreten anticossos

**Taula 1.-** Alguns dels models de ratolins transgènics pel BCR i les característiques fenotípiques (Adaptat de Cambier et al. 2007)<sup>111</sup>.

## 2.- La diabetis mellitus tipus 1

La diabetis mellitus tipus 1 (T1D, de l'anglès *type 1 diabetes*) és una malaltia autoimmunitària òrgan-específica, que es caracteritza per la destrucció de les cèl·lules beta dels illots de Langerhans en el pàncrees. Aquestes cèl·lules detecten la glucosa en sang i secreten insulina per mantenir la normaglicèmia. Quan aquestes cèl·lules són destruïdes com a conseqüència de la resposta autoimmunitària, es perd la capacitat de regular els nivells de glucosa en sang, i apareix hiperglucèmia, cetoacidosis, glucosúria, poliúria i polidípsia, és a dir, es desenvolupa la diabetis<sup>112</sup>. Els individus afectats per aquesta malaltia passen a ser dependents, de per vida, de l'administració d'insulina exògena, per tal de controlar la glicèmia. Tot i això, els nivells alts de glucosa en sang són difícils de regular de manera "fisiològica" i amb el temps es produeixen lesions vasculars progressives que es poden traduir en complicacions greus com ara: nefropatia, retinopatia, neuropatia perifèrica o problemes cardíacs<sup>113</sup>.

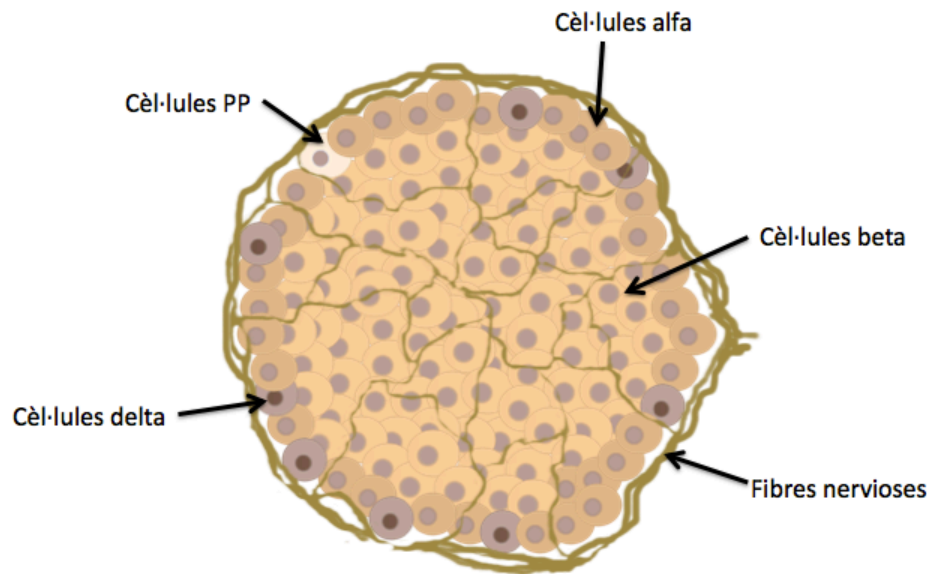
## 2.1. Pàncrees

El pàncrees és un òrgan glandular mixt, compost principalment per dues parts: el pàncrees exocrí i el pàncrees endocrí. Es troba situat a la part dorsal de l'abdomen, entre l'estómac i la corba del duodè, amb el qual es troba connectat a l'altura de l'ampul·la de Vàter, a on desemboquen el conducte pancreàtic i el conducte biliar.

El pàncrees exocrí té com a missió secretar enzims digestius i conforma la major part del pàncrees. Per la seva banda, el pàncrees endocrí té com a missió la producció d'hormones i representa entre 1-2% del teixit pancreàtic. La porció endocrina del pàncrees està conformada per diferents tipus cel·lulars que es troben agrupats que s'anomenen illots pancreàtics o illots de Langerhans, en mig del teixit exocrí.

El pàncrees humà conté al voltant d'un milió d'illots, que estan formats per un valor variable de cèl·lules, que va entre 2.500 fins a 12000 cèl·lules. S'agrupen en una forma arrodonida i amb una distribució semblant entre els mamífers. En el ratolí, els illots estan formats per un nucli de cèl·lules beta, productores d'insulina, que conformen el 70% de la massa cel·lular de l'illot. Rodejant aquest nucli (cèl·lules beta) es troben els altres tres tipus cel·lulars endocrins: cèl·lules  $\alpha$  (20%) productores de glucagó; cèl·lules  $\gamma$  (5-10%) productores de somatostatina i cèl·lules PP que sintetitzen el polipèptid pancreàtic (2%)<sup>114</sup>. En humans i altres primats, no s'observa l'organització de nucli de cèl·lules beta i un mantell de la resta de tipus cel·lulars que l'envolten, sinó que s'observa una composició més complexa, formant diverses estructures d'aquestes en un únic illot<sup>115</sup>. Recentment, s'ha descrit un cinquè tipus cel·lular present als illots, es tracta de les cèl·lules  $\epsilon$ , productores de grelina, que podrien tenir un paper de progenitors multipotents<sup>116</sup>.

Els illots es troben embolcallats per cèl·lules de Schwann i membrana basal. Juntament amb les neurones que innerven els illots, creen una xarxa complexa que embolcalla i penetra a l'interior d'aquest. Les cèl·lules de Schwann són cèl·lules glials, però a diferència de les cèl·lules glials presents al sistema nerviós central, expressen la proteïna GFAP (*glial fibrillary acidic protein*)<sup>117</sup>. Als illots, hi ha una alta innervació i vascularització, que els permet rebre senyals fisiològics als quals han de respondre secretant les diferents hormones. Es diferencien tres tipus d'innervació: simpàtica, parasimpàtica i sensorial. Les neurones es comuniquen amb les cèl·lules de l'illot mitjançant l'alliberament de neurotransmissors. L'acetilcolina alliberada per les neurones parasimpàtiques, la noradrenalina alliberada per les neurones simpàtiques<sup>118</sup> i substància p (Sp) i el pèptid relacionat amb el gen de calcitonina (CGRP, de l'anglès *calcitonin-gene-related peptide*) alliberat per les neurones sensorials<sup>119</sup>.



**Figura 4.-** Esquema de l'organització d'un illot pancreàtic

## 2.2. Sistema nerviós i T1D

Les cèl·lules beta pancreàtiques són la principal diana de l'atac autoimmunitari, però no l'única. Les neurones que envolten els illots també pateixen l'atac per part de limfòcits autoreactius. Aquest atac es podria explicar, en part, perquè aquestes cèl·lules comparteixen antígens amb les cèl·lules beta pancreàtiques. Tot i això, la presència de limfòcits T i B autoreactius contra elements del sistema nerviós, en estadis inicials de la malaltia, reforça la hipòtesi que l'atac a les cèl·lules neuronals, podria ser previ a l'atac a les cèl·lules beta pancreàtiques<sup>120</sup>.

A més de l'interacció amb les cèl·lules de l'illot, per tal de regular la producció d'hormones, les cèl·lules nervioses també interaccionen amb les cèl·lules del sistema immunitari infiltrants en els illots durant el procés de resposta autoimmunitària que s'esdevé en la T1D. Aquesta interacció no només és com a conseqüència de l'atac, sinó que el sistema nerviós té la capacitat de modular la resposta immunitària, mitjançant els neurotransmissors alliberats als extrems terminals de les neurones<sup>121,122</sup>.

En el model NOD, s'ha descrit un defecte funcional en les cèl·lules sensorials, concretament, en les cèl·lules que expressen el receptor TRPV1 (de l'anglès *transient receptor potential vanilloid-1*). El gen que codifica per aquesta proteïna està localitzat en un *loci* de susceptibilitat de la malaltia<sup>123</sup>. Recentment, també s'ha correlacionat mutacions en aquesta proteïna amb l'aparició de la malaltia en humans<sup>124</sup>.

Aparentment, la relació entre el sistema immunitari i els elements neuroendocrins de l'illot, podria ser més complexa que el simple atac autoimmunitari. Per tant, esdevé necessari conèixer en més profunditat les interaccions que tenen lloc entre les neurones, les cèl·lules de l'illot i les cèl·lules immunitàries, en el decurs de la malaltia, per tal de poder comprendre millor l'etiologia de la T1D.

## **2.3. Epidemiologia**

La diabetis mellitus tipus 1 és una de les malalties pediàtriques cròniques més comunes. A l'estat espanyol, cada any es diagnostiquen entre 12-20 nous casos per cada 100.000 habitants<sup>125</sup>. La T1D apareix de forma sobtada durant la infància i l'adolescència, amb pic de màxima incidència entre els 10 i 14 anys. Tot i que la T1D és popularment coneguda com a diabetis infantil o juvenil, també pot aparèixer en l'edat adulta, que és el que es coneix com a LADA (de l'anglès *latent autoimmune diabetes of adults*)<sup>126</sup>.

La incidència de la malaltia té grans diferències geogràfiques, amb més prevalença en els països desenvolupats. En els països del nord d'Europa és a on es troba la incidència més alta de la malaltia. En certes regions de Finlàndia, la incidència de la malaltia arriba a més de 40 casos anuals per cada 100.000 habitants. En contraposició, països com Xina i Veneçuela tenen una incidència anual de 0,1 casos per cada 100.000 habitants.

Estudis realitzats a escala mundial van concloure que la incidència de la T1D està en augment. Actualment, la incidència de la malaltia incrementa al voltant d'un 3,4% anualment. En els infants més joves, de 0 a 4 anys, és on es troba l'increment més gran de la incidència (6,3%)<sup>127</sup>.

## **2.4. Etiologia**

Igual com passa a moltes malalties autoimmunitàries, la susceptibilitat d'un individu a desenvolupar la T1D té un fort component genètic, ja que s'observa una susceptibilitat hereditària a manifestar la malaltia. Tot i això, la concordança d'aparició en germans bessons monozigòtics és només d'un 50%, fet que indica que hi ha altres factors, a més a més de l'herència genètica, que tenen rellevància per l'aparició de la T1D<sup>128</sup>.

### **2.4.1.Factors genètics**

Gràcies a l'estudi realitzat a mitjans del 2000 d'associació al genoma amb la T1D ("Genome-Wide Association Studies" GWAS) actualment, es coneixen fins a 60 *loci* de susceptibilitat a la diabetis. En la majoria de casos, no es coneix quin és el gen causant de la susceptibilitat, només es coneix la regió cromosòmica a on es troben.

Dintre dels *loci* associats a la susceptibilitat (coneguts com a IDDM de l'anglès "Insulin Dependent Diabetes Mellitus") es poden diferenciar dos grans grups, els que es troben associats als complexos majors d'histocompatibilitat (MHC), en humans antigen leucocitari humà (HLA)<sup>129</sup>, i els que es troben fora d'aquests *loci*.

#### 2.4.1.1. Gens de la regió HLA

Els primers gens relacionats amb la susceptibilitat a diabetis van ser els gens que codifiquen per al HLA, i conformen el IDDM1. De fet, se sap que els gens HLA DR i HLA DQ són els que tenen un paper més rellevant a l'hora de determinar la susceptibilitat a la T1D. La presència de determinats al·lels del complex HLA, concretament els al·lels: DRB1\*03, DRB1\*0401, DRB1\*0402, DRB1\*0405, DQA1\*0301, DQB1\*0302, DQB1\*0201, aporten susceptibilitat a patir la malaltia. Per contra, altres al·lels del complex HLA aporten protecció, com ara: DRB1\*1501, DRB1\*1401, DRB1\*0701, DQB1\*0602, DQB1\*0503, DQB1\*0303. Aquests últims dominen sobre els al·lels de predisposició, suggerint que és més important el rol de protecció del HLA que el de predisposició<sup>112,128</sup>.

Recentment, s'ha descrit que determinats al·lels en els gens de HLA de classe I, també podrien aportar susceptibilitat a la malaltia. Concretament, els gens de HLA-A i HLA-B. L'al·lel HLA-A\*0201 és un dels més prevalents en pacients diabètics, el presenten més del 60% dels pacients. Per la seva banda, la presència de l'al·lel HLA-B\*39 està relacionat amb el diagnòstic de la malaltia en edats més joves<sup>130</sup>.

#### 2.4.1.2. Gens no HLA

A més dels gens de HLA, descrits anteriorment, existeixen altres *loci* que aporten susceptibilitat a la malaltia, entre els quals destaca el IDDM2, que està relacionat amb el gen de la insulina<sup>131</sup>. Concretament, amb la zona del promotor d'aquest gen, a on es troben un nombre variable de repeticions en tàndem (*variable number of tandem repeats*, VNTR), que influenciarien en l'expressió de la insulina en l'àmbit tímic. De manera que, individus amb un major nombre de repeticions expressarien més insulina al timus, i propiciaria a una major eliminació de cèl·lules T autoreactives contra insulina, que afavoriria a la protecció de l'individu enfront de



la malaltia. En canvi, els individus amb un menor nombre de repeticions serien més propensos al desenvolupament de la malaltia<sup>130</sup>.

Altres gens relacionats amb la susceptibilitat a la T1D, són gens que estan involucrats amb la resposta immunitària, com són: IL2<sup>132</sup>, IL-2RA (CD25), CTLA-4<sup>133</sup>, PTPN22, Pdca1 (PD-1) i CLEC16A<sup>134</sup>. Mutacions, canvis en els nivells d'expressió o defectes funcionals en aquests gens aporten desregulacions a la resposta immunitària, i afavoreixen l'aparició de la T1D, entre altres malalties autoimmunitàries. En la majoria de casos, les proteïnes codificades per aquests gens estan implicades en l'homeòstasi del sistema immunitari, ja sigui de forma directe modulant el senyal en els receptors de les cèl·lules T i B, o de forma indirecta mitjançant el control de cèl·lules reguladores, crucials pel control de l'autoimmunitat<sup>112</sup>.

#### ***2.4.2.Factors ambientals***

Com s'ha comentat anteriorment, l'aparició de la diabetis no només es pot explicar a partir de factors genètics. Entre els factors ambientals que influeixen en l'aparició de la malaltia, destaquen les infeccions i la dieta.

##### ***2.4.2.1.Exposició a agents microbians***

Existeix una dualitat pel que fa el contacte amb determinats agents microbians, com a possibles promotors de la malaltia. D'una banda, s'ha postulat que infeccions virals podrien ser desencadenants de malalties autoimmunitàries<sup>135</sup>, i la T1D com a tal no en seria una excepció<sup>136</sup>. D'altra banda, la manca de contacte amb diferents microorganismes, afavoriria que el sistema immunitari ataqués el mateix organisme, és el que es coneix com a hipòtesis de la higiene<sup>137</sup>.

Les infeccions virals, especialment dels virus amb tropisme a les cèl·lules beta-pancreàtiques, s'han postulat com a possibles desencadenants de la diabetis. En els estudis realitzats per Foulis l'any 1987, es va descriure com les infeccions virals, a les cèl·lules beta pancreàtiques, tenen la capacitat d'iniciar una inflamació a l'illot<sup>138</sup>. També s'ha descrit, en els illots de pacients que debuten en la malaltia, nivells alts d'INF- $\alpha$  i MHC de classe I, molècules que són firma d'una infecció viral. Aquestes molècules reclutarien els limfòcits CD8, responsables de l'atac a les cèl·lules beta pancreàtiques<sup>139</sup>.

Entre els virus candidats, com a possibles desencadenants de la diabetis, cal destacar els enterovirus, i concretament el Coxsackievirus B<sup>140</sup>. En pacients de

debut a la malaltia, s'han detectat títols alts d'anticossos contra aquest virus. D'altra banda, aquest mateix virus va poder ser aïllat del pàncrees d'un nen diabètic que va morir en el moment del debut de la malaltia<sup>141</sup>.

El mecanisme que s'ha postulat podria estar implicat en aquest fenomen seria el mimetisme molecular de determinats antígens de l'àcid glutàmic descarboxilasa (GAD) i components d'alguns virus, com el ja esmentat coxsackievirus<sup>140</sup>. Això mateix podria passar també amb altres virus i altres autoantígens com és la rubeola<sup>142</sup>.

Tot i això, cal destacar que no s'ha pogut demostrar una causalitat directe entre infecció viral i la diabetis. Això pot ser degut a la llarga fase subclínica de la malaltia, i/o que sigui necessàries la conjunció de diferents factors, per tal de crear l'ambient idoni, perquè es pugui presentar l'autoimmunitat. Aquesta hipòtesi es coneix com a camp fèrtil (*fertile field*)<sup>136</sup>.

En contraposició a les infeccions virals tenim la "hipòtesi de la higiene", a on es postula que l'augment de les malalties autoimmunitàries i al·lèrgies, en els països desenvolupats, és degut al descens d'infeccions, principalment en la infància, causat per la millora de les condicions higièniques<sup>137</sup>. No es coneix bé quin seria el mecanisme a partir del qual les infeccions protegirien de l'autoimmunitat i al·lèrgies. No obstant això, hi ha evidències que donen suport a aquesta hipòtesi, com és el fet que trobem menor incidència de malalties autoimmunitàries i al·lèrgies en els països menys desenvolupats. La incidència de les malalties autoimmunitàries correlaciona amb el grau de desenvolupament dels països, de manera que s'observa un gradient d'afectació d'autoimmunitat de nord a sud, a l'hemisferi nord<sup>127</sup>. Amb l'excepció de Sardenya, una illa a la mediterrània que presenta un dels índexs més alts de prevalença de malalties autoimmunitàries. Es creu que les infeccions helmíntiques mantenen silent els gens de susceptibilitat a la malaltia, i que per això, després de l'eradicació de la malària hi ha hagut un increment de malalties autoimmunitàries, sobretot amb nombre pacients d'esclerosi múltiple<sup>143</sup>.

#### 2.4.2.2. Dieta

La ingesta de determinats aliments, podria afavorir a l'aparició de la diabetis. Entre aquests aliments destaca la llet de vaca. Així, en el sèrum dels pacients diabètics s'ha detectat la presència d'anticossos que reconeixen albúmina, present a la llet de vaca. És interessant destacar que aquests anticossos reconeixen també una proteïna de la superfície de les cèl·lules beta pancreàtiques ICA-I (p69), fet que podria promoure l'autoimmunitat a l'illot. Concretament, estudis realitzats en el

model animal NOD, es va veure que una forma hidrolitzada de l'albumina reduïa la incidència de diabetis<sup>130</sup>.

La ingesta de blat, més concretament de gluten, també podria ser un factor que afavorís el desenvolupament de la diabetis, tot i això, no es coneix quin seria el paper d'aquesta proteïna en la promoció de l'autoimmunitat. S'ha observat una major reactivitat de cèl·lules T contra el gluten en l'inici de la malaltia, a més, entre els pacients que desenvolupen diabetis trobem que més d'un 10% són celíacs, fet que porta a pensar, que hi ha relació entre el gluten i el desenvolupament de la diabetis, com a mínim en alguns individus<sup>144</sup>.

Finalment, també s'ha postulat la manca de vitamina D a la dieta com a promotor de la T1D. En pacients que debuten en la diabetis, s'ha observat nivells més baixos d'aquest metabòlit en plasma. A més, la manca de la vitamina D correlaciona amb el gradient nord-sud d'incidència de les malalties autoimmunitàries, exceptuant l'illa de Sardenya<sup>143</sup>.

#### ***2.4.3.Factors estocàstics***

El desenvolupament de la diabetis mellitus tipus 1 està associada a factors molt diversos, com s'ha comentat anteriorment. No hi ha cap factor que per si sol permeti desenvolupar la malaltia. És necessària la conjunció de diferents factors genètics i ambientals en un mateix individu per tal d'originar un procés d'autoimmunitat, per tant, l'atzar també juga un paper rellevant. En aquest sentit es pot especular en la pubertat, amb el conseqüent canvi hormonal, o bé la presència d'un o diversos clons autoreactius en un moment determinat, i no en un altre, podrien jugar-hi un paper rellevant en el desenvolupament de la T1D.

### **2.5. Histopatologia**

Els estudis histopatològics portats a terme en la diabetis tipus 1 no han estat molt nombrosos, a causa de la complicació a l'hora d'obtenir mostres del teixit. La majoria dels estudis duts a terme han estat realitzats a partir de la donació d'òrgans, procedents de pacients que han traspassat<sup>145</sup>.

Gràcies als estudis realitzats en pacients que debutaven en la malaltia, s'ha descrit que els limfòcits CD8 són majoritaris a l'infiltrat, seguits dels limfòcits CD4 i limfòcits B presents en menor nombre, tot i que aquests últims, en alguns estudis no s'han pogut observar. També s'ha descrit la presència de macròfags a l'infiltrat leucocitari, i en algunes ocasions cèl·lules dendrítiques. En rares ocasions s'ha

descriu la presència d'altres cèl·lules com són els limfòcits T reguladors (Treg), cèl·lules plasmàtiques o cèl·lules NK<sup>146</sup>.

S'ha descrit una expressió alta de molècules de MHC de classe I a la seva superfície de les cèl·lules beta pancreàtiques, fet que afavoria l'acció citotòxica dels CD8<sup>147</sup>. No es coneix del cert quina seria la via de destrucció de les cèl·lules beta pancreàtiques; es postula que podria ser a través de l'acció directa de la perforina/granzima alliberada pels limfòcits CD8, a la vegada que per la via del Fas- FasL. En aquesta via podrien tenir-hi un paper rellevant els macròfags, ja que promourien l'expressió de la molècula Fas, a la superfície cel·lular de les cèl·lules beta pancreàtiques, mitjançant l'alliberament de citoquines proinflamàtòries, com són TNF-alfa i IL-1B<sup>146</sup>.

Tampoc es coneix quin seria l'instigador del procés, però la hipòtesi més acceptada és que la combinació de factors genètics i ambientals afavoririen l'atac autoimmunitari als illots, fet que portaria a la destrucció de la massa beta cel·lular, l'aparició d'autoanticossos, hiperglucèmia i la pèrdua total de producció del pèptid C<sup>130</sup>.

Actualment, i com a conseqüència de les limitacions tècniques que comporta realitzar els estudis en humans, la major part dels coneixements, sobre els mecanismes patogènics que es duen a terme en el decurs de la diabetis, s'han obtingut gràcies a l'ús de models animals.

## **2.6. Mecanismes efectors**

### **2.6.1. Els limfòcits T**

Dels resultats obtinguts dels estudis realitzats en humans, i en models murins, queda clar que la destrucció de les cèl·lules beta pancreàtiques es deguda a la resposta autorreactiva del sistema immunitari, concretament pels limfòcits T. Així, se sap que és necessària la presència dels limfòcits T CD4 i CD8 per tal d'iniciar la malaltia. Es creu que en un primer estadi, s'activen els limfòcits CD4 autoreactius, i posteriorment, els limfòcits CD8 que es desplacen a l'illot per tal de destruir la cèl·lula beta<sup>148</sup>. Estudis realitzats en el model NOD, posen en relleu la importància dels limfòcits B, ja que sense la presència d'aquests els ratolins no desenvolupen la malaltia<sup>149</sup>.

Es creu que, en l'inici de la malaltia, els limfòcits T CD4 autoreactius s'activarien al gangli limfàtic regional mitjançant la presentació d'un autoantigen, per part d'una cèl·lula dendrítica procedent del pàncrees. Una vegada activats els limfòcits CD4+ ajudarien en el mateix gangli a l'activació de limfòcits CD8+ autoreactius i també a

limfòcits B<sup>150</sup>. Seguidament, els limfòcits T CD4 i CD8 autoreactius infiltrarien l'illot pancreàtic i alliberarien citokines que mobilitzarien la resta de cèl·lules<sup>151</sup>. No es coneix quin és l'antigen desencadenant de la malaltia, tot i això hi ha estudis que apunten que podria ser la insulina, la IGRP, el GAD i I-A2 entre d'altres (Taula 2 i 3) produïts tots ells per les cèl·lules beta pancreàtiques<sup>152,150, 153</sup>.

S'ha postulat que l'existència dels limfòcits CD4 i CD8 autoreactius seria conseqüència d'un defecte en els mecanismes de tolerància central, de manera que permetrien als limfòcits CD4 autoreactius escapar-se de la selecció negativa. Tot i el paper determinant que tenen els limfòcits T en l'evolució de la diabetis com a cèl·lules efectores, cal posar en manifest també el seu paper com a cèl·lules reguladores. Tant els limfòcits CD4, com els CD8<sup>154</sup>, tenen poblacions cel·lulars amb capacitat reguladora. Les cèl·lules T CD4+ reguladores es caracteritzen per l'expressió del factor de transcripció Foxp3<sup>155</sup>. Pel que fa les cèl·lules T CD8+ reguladores, el seu fenotip és encara poc conegut.

Les cèl·lules T reguladores (Treg) tenen la capacitat de suprimir l'acció dels limfòcits T autoreactius a la perifèria. En el model NOD, s'han descrit l'existència d'un menor nombre de cèl·lules reguladores. També, en l'àmbit dels illots pancreàtics de ratolins NOD, s'ha descrit una baixada en el percentatge de cèl·lules Tregs a mesura que avança la infiltració leucocitària, fet que fa a pensar en una fallada local de la immunoregulació<sup>156</sup>.

### **2.6.2.Els limfòcits B**

Tot i que se sap que la destrucció de les cèl·lules beta pancreàtiques és causada per l'acció dels limfòcits T, altres cèl·lules del sistema immunitari són necessàries per a què es desenvolupi el procés diabetogènic. Entre aquestes cèl·lules s'hi troben diferents tipus cel·lulars com són: els limfòcits B, les cèl·lules dendrítiques i els macròfags<sup>148</sup>; Tots ells comparteixen la funció de cèl·lules presentadores d'antigen (APC) a limfòcits T.

En estudis realitzats en el model NOD, s'ha observat que els ratolins NOD IgM null/- (deficients de limfòcits B) presenten resistència i/o endarreriment a l'hora de desenvolupar la malaltia. De la mateixa manera, s'ha mostrat que la supressió de l'expressió de la molècula MHC de classe II (I-Ag7), a la superfície cel·lular dels limfòcits B, aporta resistència a la diabetis en els ratolins, encara que aquests presentin altres APCs capaces d'activar els limfòcits T CD4<sup>157</sup>. No obstant això, també s'han descrit casos on la presència dels limfòcits B no és estrictament necessària. Entre aquests destaca el cas d'una persona afectada per agammaglobulinèmia lligada al cromosoma X, que tot i presentar un dèficit de limfòcits B, va desenvolupar diabetis autoimmunitària<sup>158</sup>. També s'ha descrit que

els limfòcits B són prescindibles, en models de diabetis induïts per virus. A la vista dels diferents resultats, es podria apuntar que el paper dels limfòcits B en el decurs de la malaltia és actuant com a APC, no necessàries pel desenvolupament, però si per la potenciació d'aquesta<sup>159,160</sup>.

El primer contacte que tenen els limfòcits T amb les cèl·lules APC és als ganglis limfàtics regionals, a on aquestes últimes presenten els antígens<sup>161</sup>. Normalment, les cèl·lules APC presenten antígens propis, procedents de la regeneració de teixits, que són presentats als limfòcits T. Si la presentació es porta a terme sense la presència de molècules coestimuladores i citoquines proinflamatòries (IL-2, IL-4), els limfòcits T que reconeixen antígens propis són anergitzats. En canvi, si els autoantígens es presenten juntament amb molècules coestimuladores i citoquines, s'indueix l'activació dels limfòcits T CD4 autoreactius<sup>162</sup>. Actualment es creu que els limfòcits B contribuirien a la malaltia actuant com a ACPs activant limfòcits CD4 autoreactius. Altres estudis apunten que els limfòcits B podrien activar també els limfòcits CD8, mitjançant la presentació creuada a través de molècules MHC de classe I<sup>163</sup>.

La captació de l'antigen per part dels limfòcits B es pot dur a terme per endocitosi, mitjançada pel BCR de membrana<sup>164</sup>. En estudis realitzats pel grup del Dr. Thomas en models animals van demostrar que l'afinitat entre el BCR i l'autoantigen té impacte sobre el desenvolupament de la malaltia. De manera que, els animals que presenten un BCR transgènic amb major afinitat per l'autoantigen (en el cas de l'estudi l'autoantigen diana era la insulina) tenen un debut accelerat de la malaltia, mentre que els que presenten un BCR amb menor afinitat, o sense afinitat per un autoantigen, desenvolupen una forma més tardana de la malaltia<sup>165</sup>.

Els limfòcits B, igual que els limfòcits T, migren a l'illot pancreàtic durant el desenvolupament de la malaltia, suggerint que també podrien dur a terme la seva funció *in situ*. De fet, diversos estudis apunten cap aquesta direcció<sup>166,167</sup>.

El paper dels anticossos en el decurs de la malaltia encara és font de discussió. Tot i que s'ha descrit la presència d'anticossos al llarg de la malaltia NOD i humans, des de la fase preclínica fins més enllà del debut en la malaltia, no es coneix l'impacte que tindrien pel desenvolupament de la diabetis. En estudis realitzats en models NOD, es va observar que la transferència d'immunoglobulines a animals NOD.IgM.null-/- no causava cap efecte sobre la incidència de la malaltia<sup>168</sup>. D'altra banda, quan la transferència d'anticossos és materno-fetal, via trasplacentària, pot contribuir al desenvolupament de la malaltia<sup>169</sup>.

### 2.6.2.1. Autoanticossos

La presència d'autoanticossos en pacients diabètics, o en models animals, ha permès avançar molt en la investigació d'aquesta malaltia. Tot i que la resposta autoimmunitària contra les cèl·lules beta pancreàtiques és de tipus cel·lular, hi ha un fort component humoral, encara que no es té certesa del paper que podrien dur a terme els autoanticossos en el decurs de la malaltia. La detecció d'autoanticossos en sèrum s'utilitza com a eina predictiva de l'aparició de la diabetis. A partir de l'estudi dels autoanticossos, produïts en el decurs de la malaltia, s'ha permès identificar autoantígens rellevants<sup>170</sup>.

La presència d'autoanticossos es detecta en estadis previs al debut de la malaltia, en el sèrum del pacient, és per això que s'utilitza com a eina predictiva o de diagnòstic. No obstant això, no tots els autoanticossos tenen el mateix valor predictiu, ni la presència d'autoanticossos en sang comporta necessàriament l'aparició de la malaltia<sup>171</sup>. Els primers autoanticossos descrits van ser anticossos que reaccionaven contra illot (ICAs). Actualment s'utilitzen altres anticossos amb més valor predictiu com són: anticossos anti-insulina (IAA)<sup>172</sup>, anti-GAD<sup>173</sup>, anti-IA2<sup>174</sup> i anti-Zn8T<sup>175</sup>. S'ha observat que entorn del 98% dels pacients que debuten en la malaltia presenten algun d'aquests anticossos.

Per tant es creu que els autoanticossos a sèrum són un reflex, a la perifèria, de l'atac immunitari que es porta a terme en els illots. En els pacients diabètics, s'observa un canvi d'isotip dels autoanticossos, que passa de IgM a IgG, fet que indica una maduració d'afinitat envers l'antigen. No es coneix el paper dels anticossos en el decurs de la malaltia, alguns grups han relacionat la capacitat de la IgG per penetrar als teixits, activar el complement, i unir-se al receptor FC dels macròfags i cèl·lules NK, amb la inducció de la citotoxicitat cel·lular depenent d'anticossos<sup>176</sup>.

### 2.6.2.2. Autoantígens reconeguts pels limfòcits B

Com s'ha comentat anteriorment l'especificitat antigènica dels limfòcits B és un aspecte important a tenir en compte en l'estudi d'aquesta població cel·lular. Fins el dia d'avui, l'estudi de l'especificitat antigènica dels limfòcits B s'ha abordat de dues maneres: per una banda, l'estudi dels anticossos del sèrum de pacients diabètics o prediabètic i de model NOD; i per altra banda, mitjançant la generació d'hibridomes de limfòcits B perifèrics (en sang humana<sup>177</sup>, melsa de la rata BB<sup>178</sup> i melsa i illot de ratolí NOD<sup>179,144,180</sup>).

A partir dels resultats obtinguts, s'ha descrit una important resposta autoreactiva dels limfòcits B contra una àmplia varietat d'autoantígens de la cèl·lula beta i de les

cèl·lules neuronals, entre els quals destaquen la insulina<sup>172</sup>, GAD<sup>173</sup>, IA-2<sup>181</sup>, periferina<sup>182</sup> i GFAP<sup>183</sup>.

A la taula 2 i 3, es mostren els autoantígens reconeguts pels limfòcits B i la seva localització.

Autoantigen	Localització
Insulina	Cèl·lules beta
DNA topoisomerasa II	Ubiqua (nuclear)
GLUT2	Ubiqua
HSP-60	Ubiqua (induïble)
HSP-90	Ubiqua (induïble)
Jun-B	Ubiqua (nuclear)
Sox 13 (ICA12)	Ubiqua (nuclear)
Reg	Pàncrees
ATP4B	Gàstric
TPO	tiroide
TGM	Ubiqua
ZnT8	Cèl·lula beta
KCNRG	Ubiqua
IGRP	Cèl·lula beta

**Taula 2.-** Llistat d'autoantígens reconeguts pels limfòcits B, i la seva distribució a l'organisme. En aquest llistat no s'hi inclouen els autoantígens neuroendocrins (adaptat de Lieberman et al. 2003)(adaptat de Burbelo et al. 2010)<sup>144,180</sup>.

Autoantigen neuroendocrí	Resposta limfòcits T
GAD65	CD4 i CD8
IA-2	CD4 i CD8
IA-2beta	CD4
GAD67	CD4
Carboxipeptidasa H	-
Glima 38	-
GM2-1	-
GT3	-
ICA69	CD4
S100 beta	CD4
Sulfatide	-
GFAP	CD4 i CD8
Periferina	CD4

**Taula 3.-** Llistat d'antígens neuroendocrins reconeguts pels limfòcits B, a la taula també es descriu si hi s'ha descrit resposta cel·lular (adaptat de Lieberman et al. 2003 i Burbelo et al. 2010)<sup>144,180</sup>.



## **2.7. Perspectives de futur**

Avui en dia, el tractament per la diabetis, és l'administració exògena d'insulina. Tot i que aquest tractament permet controlar la glucèmia, no deslliure de les possibles complicacions que comporta la hiperglucèmia<sup>113</sup>. Una teràpia que s'està portant a terme des de fa temps, però sense massa èxit és el trasplantament d'illots. Tot i que aquesta teràpia restaura la funció de les cèl·lules beta pancreàtiques, ha d'anar acompanyada per l'administració d'immunosupressors, per tal que no es reproduïxi l'atac autoimmunitari. Avui en dia es treballa per implantar illots encapsulats per tal d'evitar el contacte entre els illots i el sistema autoimmunitari, però a la vegada permetre l'arribada d'oxigen i altres nutrients, per fer viable els illots trasplantats<sup>184</sup>.

Actualment s'està treballant en teràpies que previnguin la diabetis i evitin l'atac autoimmunitari. Així, com en diferents malalties autoimmunitàries, s'han provat diferents tractaments. Una via de treball és l'administració d'immunosupressors que frenen l'atac autoimmunitari, com és l'ús d'anticossos anti-CTLA-4<sup>185</sup>, anti-CD3, o anti-CD20<sup>186</sup>. Aquests tractaments frenen la resposta autoimmunitària, però a la vegada immunodeprimeixen els pacients. Un altre tipus d'immunosupressió més dirigida és l'ús d'anticossos contra determinades citoquines, amb aquestes teràpies es pretén frenar la cascada proinflamatòria<sup>187</sup>. Un exemple d'aquest tractament, és l'ús de l'anti-TNF en pacients amb artritis reumatoide amb molt bons resultats<sup>188</sup>.

Actualment es troben en estudi diverses aproximacions terapèutiques, entre les quals destaquen l'administració de pèptids, ja siguin sols o ancorats al complex MHC, vacunes de DNA plasmídic que expressen els antígens desitjats, o vacunes amb cèl·lules dendrítiques tolerogèniques<sup>189, 190</sup>.

## **3.- Models animals**

Els models animals han contribuït, i contribueixen, enormement en l'estudi de les malalties que afecten als humans. Actualment, els models animals són una eina indispensable per l'estudi dels mecanismes fisiològics i fisiopatològics que tenen lloc *in vivo*. En el cas de l'estudi de la diabetis, els models són especialment necessaris, degut a la impossibilitat d'obtenció de mostres i el difícil accés al pàncrees.

Els primers estudis dirigits a conèixer l'origen de la Diabetis Mellitus es van realitzar a principis del segle vint en animals pancreatomitzats. Aquests estudis

varen ser claus pel descobriment de la insulina per part dels canadencs F.G. Banting i C. Best, fet que els va merèixer el premi Nobel de Medicina l'any 1923. Als anys seixanta els models de diabetis induïda quirúrgicament van deixar pas als models induïts mitjançant l'ús de tòxics per cèl·lules beta com ara l'estrepto-zooticina<sup>191</sup>. No va ser fins a principis dels anys 80 quan es van desenvolupar models de diabetis espontània, mitjançant el creuament congènit de línies, en les que es seleccionaven els individus hiperglucèmics. D'aquesta manera es van originar els dos models de diabetis espontània més utilitzats actualment, com són el model de ratolí NOD (Non-Obese Diabetic) i el model de rata BB (BioBreeding)<sup>192</sup>.

### **3.1. Model NOD**

El model NOD (Non-Obese Diabetic) és un excel·lent model per l'estudi dels mecanismes implicats en el desenvolupament de l'autoimmunitat, més concretament de la T1D, i en definitiva dels mecanismes de regulació i tolerància immunològica<sup>193</sup>. D'ençà que va ser descrit el 1980, aquest model ha estat àmpliament utilitzat en l'estudi de la T1D, ja que els animals desenvolupen insulitis i diabetis de forma espontània, amb una patologia semblant a la que s'observa en humans, amb presència de cèl·lules T CD4+ i CD8+ autoreactives, limfòcits B productors d'autoanticossos, cèl·lules dendrítiques, macròfags i cèl·lules NK<sup>192</sup>.

En els ratolins NOD l'infiltrat leucocitari comença a envair els illots pancreàtics a partir de les 3-5 setmanes d'edat, mentre que la manifestació clínica de la malaltia (hiperglucèmia) apareix entre les 12 i 30 setmanes. Tot i ser una soca congènita, en la que tots els individus són genèticament iguals i tots desenvolupen insulitis, no tots presenten diabetis. La incidència de la malaltia es troba entre 60-90% de les femelles i entre 10-40% dels mascles, quan aquests animals es troben en ambients microbiològics controlats (SPF, de l'anglès *Specific pathogen free conditions*), i alimentats amb dietes riques en fibres vegetals. Aquesta variabilitat en la incidència posa en evidència que altres factors aleatoris, com poden ser el nivell de les hormones sexuals i/o l'estat maduratiu del sistema immunològic, també tenen una gran importància<sup>193</sup>.

En el model NOD, múltiples *loci* controlen la susceptibilitat a la diabetis (denominats "idd"). D'alguns d'aquests loci es coneix quin és el geni implicat i s'ha observat que són compartits amb els pacients diabètics, és a dir que també són gens de susceptibilitat de la T1D en humans.

Entre aquests gens destaquen el gen per CTLA-4 (idd5.1)<sup>194</sup> i el de IL-2 (idd3)<sup>195</sup>. També el complex MHC és un dels factors genètics més rellevants. La molècula de MHC de classe II correspon al idd1. En el ratolí NOD només s'expressa l'haplotip de MHC H-2g7, de manera que en la superfície cel·lular del ratolí només s'expressa la molècula I-Ag7 (No expressa la molècula I-E a causa d'una mutació que afecta el gen de la cadena alfa d'aquesta molècula). La molècula I-Ag7 presenta un canvi aminoacídic a la posició 57 que causa una unió "promiscua" del pèptid<sup>196</sup>. En humans, s'ha descrit que el mateix canvi aminoacídic en la molècula MHC de classe II, DQ comporta també aquesta susceptibilitat<sup>197</sup>.

En el model NOD, s'han descrit diferents defectes en el sistema immunitari que podrien estar involucrats en el desenvolupament de la malaltia. Entre els defectes descrits destaquen defectes en la maduració i funció dels macròfags; defectes en la funció de les NKT<sup>198</sup> i disminució del nombre de NK<sup>199</sup>. També s'han descrit deficiències en les cèl·lules Tregs, així com defectes en la senyalització a través del TCR, que repercuteixen en la resposta per part dels limfòcits T<sup>200</sup>. En referència als limfòcits B, s'ha descrit un augment de la població dels limfòcits B de la zona marginal, en comparació a la soca C57BL/6, una soca resistent a l'autoimmunitat<sup>201</sup>.

A part de la diabetis tipus 1, el model NOD és susceptible a altres trastorns autoimmunitaris, fet que podria ser explicat pels defectes en el sistema immunitari, anteriorment esmentats. Entre els diferents trastorns autoimmunitaris que s'han descrit en el ratolí NOD destaquen la tiroiditis autoimmune<sup>202</sup>, sialadenitis autoimmune<sup>203</sup> i polineuropatia autoimmune perifèrica<sup>204</sup>. El conjunt d'aquests trastorns, dona suport als qui qüestionen la validesa del model per a l'estudi de la diabetis autoimmune. Tot i això, el model NOD és un dels models de referència per l'estudi de la T1D. Estudis realitzats en el model NOD han permès identificar mecanismes immunopatològics, *loci* de susceptibilitat/resistència a la malaltia i autoantígens, que també intervenen en el desenvolupament de la diabetis autoimmunitària en humans. A més, variacions genètiques del model, ja sigui mitjançant la supressió de l'expressió de determinades proteïnes, o per l'expressió transgènica d'aquesta, han permès entendre millor els processos que es duen a terme en el decurs de la diabetis.

### **3.1.1. Variacions del model NOD**

A partir del model NOD, anteriorment esmentat, s'han creat nous models animals, mitjançant la modificació de diferents gens, per tal de conèixer *in vivo* la seva funció. Es presenten diferents tipus de modificacions, entre les quals destaquen la supressió de l'expressió, la sobreexpressió o l'expressió regulada d'un determinat

gen. A continuació es descriuen alguns dels models i les seves característiques més rellevants.

**NOD.RAG2<sup>-/-</sup>** : model NOD que presenta una mutació en homozigosi en el gen Rag 2 (*recombination activating genes-2*) que impossibilita la reordenació de les regions V(D)J i la posterior maduració de limfòcits B i T, i per tant, no desenvolupa la T1D<sup>205</sup>.

**NOD.IgM<sup>null</sup>**: model NOD knockout per la cadena de la immunoglobulina. La incorrecta expressió de la IgM impossibilita la maduració dels limfòcits B. Aquest model presenta un endarreriment en el debut de la malaltia i una baixada notòria en la incidència de la diabetis<sup>168</sup>.

**NOD.IgHEL.IgM<sup>null</sup>**: Model transgènic per a un BCR que reconeix la proteïna lisozim de l'ou de la gallina HEL (de l'anglès, *hen egg lysozyme*) una proteïna irrellevant pel desenvolupament de la malaltia. A la vegada també presenta la deleció del gen endogen de la immunoglobulina M, de manera que només expressa el BCR transgènic a la seva superfície. Aquest model presenta un endarreriment en el debut de la malaltia i una baixada notòria en la incidència de la diabetis<sup>108</sup>.

**B7-2KO**: Model Knockout per a la molècula coestimuladora B7-2 (CD86). Aquest animal no desenvolupa la diabetis tipus 1, no obstant això, presenta polineuropaties<sup>204</sup>.

**125TG**: Model transgènic per a un BCR que reconeix la insulina. Aquest model presenta un lleuger increment de la incidència quan només s'expressa de forma transgènica la cadena pesada del BCR, mentre que quan presenta el BCR transgènic complet la incidència de la T1D disminueix<sup>109</sup>.

**NOD8.3**: Model transgènic per al TCR dels limfòcits CD8 que reconeix el pèptid IGRP<sub>206-214</sub> en el context de molècules MHC. Aquest model presenta una forma accelerada de la malaltia<sup>206</sup>.

En el treball que es presenta a continuació descriu tres models animals generats a partir de modificacions del model NOD. Un d'ells presenta una expressió truncada d'una determinada proteïna, mentre que els altres dos expressen un BCR transgènic a la superfície dels seus limfòcits B.

#### 4.- Estudis previs

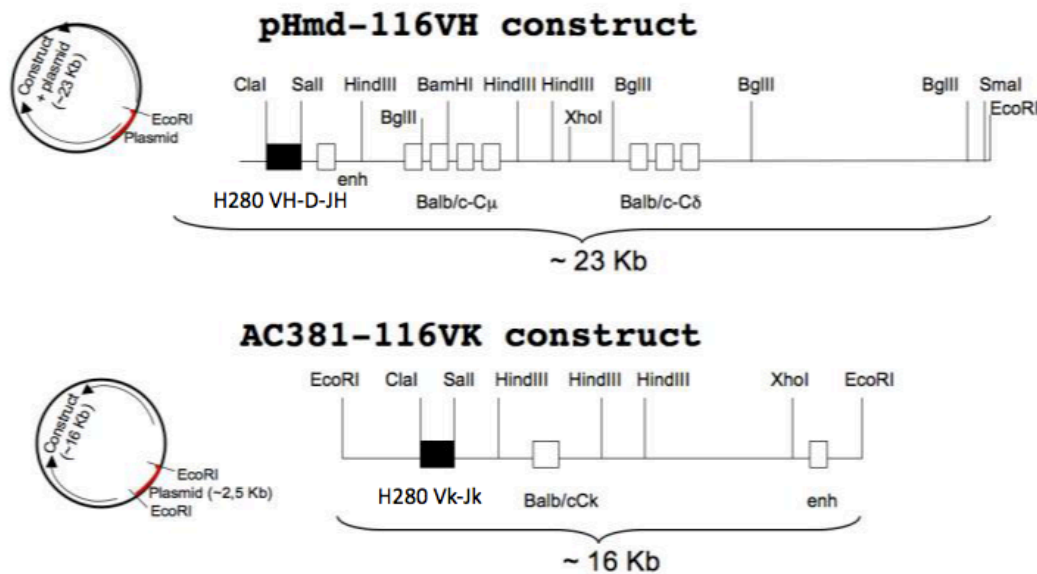
De la mateixa manera que els limfòcits T, els limfòcits B es troben presents en l'infiltrat leucocitari de l'illot pancreàtic de ratolins NOD i de pacients diabètics. Es

creu que hi podrien actuar com a cèl·lules presentadores d'antigen, encara que això no se sap en certesa.

Amb l'objectiu de conèixer més a fons el paper dels limfòcits B infiltrants en els illots pancreàtics, en el nostre laboratori es va generar una col·lecció d'hibridomes de limfòcits B procedents de diferents soques de ratolí amb diferents graus d'insulitis i diabetis<sup>207</sup>. Després de la caracterització tissular dels anticossos produïts per aquests hibridomes, es va observar que la majoria dels anticossos reconeixien un filament intermedi del citoesquelet de neurones del sistema nerviós perifèric, la *periferina*<sup>208</sup>. Posteriorment, es va estudiar amb més profunditat els anticossos anti-*periferina* produïts pels hibridomes, i es va observar que tots ells presentaven l'isotip IgG, indicant que havien patit un canvi de classe. A més, l'anàlisi de les regions variables VL i VH van mostrar la presència d'hipermutacions somàtiques en dos terços dels hibridomes analitzats, indicant que hi havia sofert una maduració d'afinitat<sup>209</sup>. A la vista d'aquests resultats, es va concloure que els limfòcits B que reconeixien la *periferina* havien sigut seleccionats positivament durant el desenvolupament de la malaltia. Estudis en pacients diabètics, també han identificat la *periferina* com un dels antígens reconeguts pels autoanticossos presents al seu sèrum<sup>210</sup>.

A causa de la possible rellevància dels limfòcits B anti-*periferina* durant l'inici i/o progressió de la T1D, es va generar un ratolí transgènic portador de les immunoglobulines d'un dels hibridomes que reconeixia *periferina*. Es va escollir l'hibridoma 280, H280. Aquest hibridoma procedia d'un limfòcit B infiltrant a l'illot d'una femella diabètica NOD.

Per construir el transgen IgM/IgD, primerament es va obtenir el fragment de cDNA que codificava per la regió VDJ de la cadena pesada (IgH) de l'hibridoma H280, i es va lligar a la zona de restricció Sall-ClaI del vector pHelixmdSMI codificador de la regió intrònica del promotor del gen de la cadena pesada de la Ig i la regió Cm1-4m i la Cd1-3m procedent del genoma del ratolí Balb/c i que codifica per a la cadena  $\mu$  i  $\delta$  de les Igs de membrana i secretada (obtingut del Dr. Thierry Martin, Institute d'Hematologie et d'Immunologie, Strasbourg Cedex, França, amb el consentiment del Dr. Klaus Rajewsky, Harvard Medical School, Boston, Usa)<sup>211</sup>. També es va clonar el segment L-VJ del gen de la cadena lleugera de l'hibridoma H280 i es va inserir dintre de la regió Vk del constructe de la cadena lleugera AC38KI-Ck (també obtingut del Dr. Martin amb el consentiment del Dr. Rajewsky). Es va comprovar la correcta inserció mitjançant seqüenciació de la regió variable en els constructes.



**Figura 5.-** Esquema dels constructes per a la cadena pesada i lleugera del BCR del ratolí transgènic 280.IgH.IgL.NOD. La cadena pesada codifica per a la síntesi de la IgM i de la IgD (haplotip a), i la cadena lleugera codifica per a la síntesi de la cadena lleugera kappa.

El ratolí transgènic va ser generat als laboratoris Jackson (Maine, USA) amb la col·laboració del Dr. Serreze. Allà es van alliberar els constructes del vector, es van purificar i finalment es van microinjectar en oòcits de ratolí NOD. Es van injectar els constructes de manera independent. Primer es va obtenir el ratolí transgènic pel constructe de la cadena pesada donant lloc als ratolins 280.IgH.NOD i posteriorment el ratolí transgènic per a la cadena lleugera, generant el ratolí 280.IgH.IgL.NOD. Els ratolins transgènics resultants van ser identificats per anàlisi de PCR.

Per tal d'avaluar el paper de la periferina com a autoantigen diana en el decurs de la T1D, es va decidir generar un ratolí NOD knockout per periferina. Es va obtenir un ratolí knockout per periferina en fons genètic C57BL/6 (generat pel laboratori del Dr. Julien, McGill University, Montreal, Canadà)<sup>212</sup>, i va ser retrocreuat al fons genètic NOD (en col·laboració amb el Dr. Santamaria, Universitat de Calgary, Canadà), donant lloc als ratolins NOD.Per-/-.



#### IV- HIPÒTESI I OBJECTIUS





## **1. Hipòtesi**

La resposta autoimmunitària durant el desenvolupament de la diabetis tipus 1, va dirigida, a més de la resposta contra les cèl·lules beta dels illots pancreàtics, contra cèl·lules del sistema nerviós. Hipotetitzem que aquesta resposta vindria induïda per alteracions en la funció de les cèl·lules del sistema nerviós.

També hipotetitzem que la resposta autoimmunitària dels limfòcits B contra les neurones que innerven l'illot pancreàtic és clau pel desenvolupament de la diabetis tipus 1. Concretament, les neurones sensorials, aquelles que expressen *periferina*. Per tant, els ratolins NOD que expressen per transgènesi la immunoglobulina amb l'especificitat contra la *periferina*, procedent de l'hibridoma 280, hauria de reflexar canvis en la resposta immunitària i en la incidència de la malaltia, mostrant un augment o disminució depenent de la tolerogènesi dels ratolins de la soca NOD.

## **2. Objectiu**

L'objectiu principal d'aquest estudi és l'anàlisi funcional i fenotípic dels limfòcits B anti-*periferina* en el decurs de la diabetis tipus 1. Es pretén assolir aquest objectiu mitjançant la generació i estudi de diferents models murins de la malaltia. És també objectiu d'aquest treball realitzar un estudi histopatològic de les neurones sensorials dels ganglis dorsals raquídics dels ratolins NOD.

### ***2.1. Objectius específics:***

- Realitzar estudis histopatològics de les neurones sensorials dels ganglis dorsals raquídis durant el procés de desenvolupament de la diabetis tipus 1 en ratolins NOD i variants transgèniques i knockout d'aquesta soca.
- Estudiar l'evolució i la incidència de la malaltia en ratolins knockout del gen de la *periferina* (NOD.Per-/-).
- Estudiar l'evolució i la incidència de la malaltia en ratolins transgènics de limfòcits B anti-*periferina* 280.IgH.NOD i 280.IgH.IgL.NOD.
- Caracteritzar fenotípicament i funcionalment les diferents subpoblacions de limfòcits B dels ratolins 280.IgH.NOD i 280.IgH.IgL.NOD, de la melsa, de la cavitat peritoneal i infiltrants als illots pancreàtics.



## V- MATERIAL I MÈTODES



## 1.- Ratolins

### **1.1. Estabulació i manteniment**

En aquest treball s'han estudiat diferents models de ratolí que deriven de la modificació de la soca NOD. Aquesta soca ha estat bastament utilitzada com a model de la diabetis mellitus tipus 1, ja que presenta una forma de diabetis espontània i molt semblant a la humana. Igual que en la forma humana, l'aparició de la malaltia es veu afectada per factors ambientals.

Per tal de controlar millor les condicions ambientals, totes les soques han estat establades en condicions lliures de patògens (SPF, *specific pathogen free*) i amb la temperatura i la humitat ambiental controlada. La sala d'estabulació presenta pressió positiva d'aire per evitar l'entrada de patògens. Amb aquest mateix propòsit, tot el material que entra a la sala ha estat prèviament autoclavat o irradiat en el cas que no sigui possible autoclavar-lo, com és el cas del menjar. Les superfícies i el material utilitzat dins les sales es desinfecta amb CR-36 Mural, un producte altament bactericida i virucida, abans i després de cada ús. Tots els procediments s'han realitzat amb la màxima esterilitat i sota campana de flux laminar.

El seguiment de la malaltia es va realitzar mesurant els nivells de glucosa a l'orina periòdicament mitjançant tires reactives colorimètriques (Chroma2, CK105, Menarini Diagnostics). El diagnostic clínic (debut clínic) de la malaltia es va realitzar després de dues lectures positives (>250mg/100mL) en dos dies consecutius.

Els animals van ser alimentats *ad libitum*. Tant el disseny experimental com el manteniment dels ratolins han seguit les directrius publicades en el decret de regulació de la utilització d'Animals per a l'Experimentació de la Generalitat de Catalunya, en el marc de les directives del Consell Europeu .

### **1.2. Ratolins de la colònia**

La majoria de ratolins utilitzats en aquest estudi deriven de la soca NOD. La parella fundadora de la colònia va ser adquirida als laboratoris Jackson (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA).

El ratolí **NOD.RAG2-/-** va ser proporcionat pel Dr. Pere Santamaria (Universitat de Calgary, Canadà). Aquest ratolí NOD presenta una mutació en homozigosi en el gen *recombination activating genes-2* que impossibilita la reordenació de les regions V(D)J i la posterior maduració de limfòcits B i T.

El ratolí **280.IgH.NOD** és un animal amb fons genètic NOD portador d'un transgen que codifica per a la cadena pesada de l'immunoglobulina que reconeix la periferina, fet que incrementa els precursors contra la periferina en 1 de cada 1000. Aquest animal va ser generat en col·laboració el Dr. David Serreze (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA).

El ratolí **280.IgH.IgL.NOD** és un animal amb el fons genètic NOD portador de dos transgens que codifiquen per a la cadena pesada i lleugera d'un BCR que reconeix la periferina. De manera que tots els limfòcits B d'aquest animal reconeixen la periferina. Aquest animal va ser generat en col·laboració el Dr. David Serrez (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine).

El ratolí **NOD.Per-/-** "Knockout" de periferina va ser generat pel Dr. Julien (Universitat del Quebec, Quebec, Canadà). A continuació, va ser introduïda en el fons genètic NOD pel Dr Santamaria (Universitat de Calgary, Canadà) fins a la generació N10 F1 generant així la soca NOD.Per-/-.

El ratolí **280.IgH.NOD.Per-/-** prové del creuament de la soca 280.IgH.NOD i la soca NOD.Per-/- . Aquest animal és portador d'una deleció del gen de la periferina en homozigosi i del transgen per a la cadena pesada de la immunoglobulina.

La soca **C57BL/6** va ser adquirida als laboratoris Charles River (Boston, Massachusetts, USA). Aquest ratolí es va emprar com a control en diversos experiments.

### **1.3. Genotipatge animals**

Tots animals de les soques 280.IgH.NOD, 280.IgH.NOD.Per-/- i 280.IgH.IgL.NOD utilitzats en aquest estudi van ser genotipats per tal d'assegurar que tots eren portadors del transgen. Les soques NOD.Per-/- i 280.IgH.NOD.Per-/- també es van genotipar per tal de seleccionar els individus homozigots per la deleció del gen de periferina.

#### **1.3.1. Obtenció DNA**

La mostra de DNA que es va utilitzar per genotipar els animals es va obtenir de la cua dels ratolins. Amb la fulla d'un bisturí estèril es va tallar un fragment de 2-3 mm de la cua i es va digerir durant 16h (overnight) amb un tampó de digestió i proteinasa K.

El tampó de digestió estava compost dels següents reactius:

Reactius	Referència
50mM Tris	1.083.820.500, Merck
50mM KCl	131494.1211, Panreac
2,5mM EDTA	1.08417.0250, Merck
0,45% Nonidet P-40	28324, Pierce
0,45% tween-20	28829.183, VWR

**Taula 4.- Composició del tampó de digestió**

El tampó de digestió es va ajustar a pH 8 i es va autoclavar.

La proteinasa K (25530-031, Invitrogen) es va reconstituir en 10mM Tris (1.083.820.500, Merck), pH 7,5, 20mM Clorur de calci (1.02378.0500, Merck) i 50% glicerol (356352, CalliroChem), a una concentració final de 0,4 mg/mL. Un cop preparada, es va al·licotar i conservar a -20°C fins al moment de la seva utilització.

Cada fragment de cua es va incubar amb 250µl de tampó de digestió i 5µl de proteinasa K en un bany a 56°C durant 16 hores. Transcorregut aquest temps, es va homogeneïtzar i es va utilitzar 2,5µl del sobrenadant resultant per genotipar els ratolins.

### **1.3.2. Preparació de la reacció PCR**

Per tal d'analitzar la presència del transgens i la dels gens de periferina i Rag2 mutats és van realitzar una amplificació dels fragments d'ADN mitjançant una reacció en cadena de la polimerasa (PCR). Es van dissenyar una parella d'encebadors (*primers*) per a cada un dels fragments a amplificar. Respecte al genotipatge dels *knockout* Rag2, va ser necessari utilitzar una combinació de 3 encebadors. D'aquesta manera en el cas dels animals *wild type* apareixia una banda, en els animals *Knockout* el fragment amplificat era d'una mida menor i en els heterozigots apareixien ambdues bandes.

Per genotipar el gen de la periferina, es van utilitzar dos jocs d'encebadors, un que amplificava el gen funcional de la periferina (periferina wt), i un altre que amplificava el gen disfuncional (periferina neo).

A continuació es detallen les seqüències:



Encebadors	Seqüència	Temp. d'hibridació
Cadena pesada		
IgH Per sense	AGTGAAGCTTGAGGAGTCTGG	62ºC
IgH Per anti-sense	CCGTGGTCCCTGTGCCCC	
Cadena lleugera		
IgL Per sense	AAGATGTGACATCCAGATGAC	61ºC
IgL Per anti-sense	TTACGTTTGATTTCGAGCTTG	
Periferina wt		
Per wt sense	CAT CGGTCTGCAGCTCCTTG	62ºC
Per wt anti-sense	CGCTTGCGGGTTTCTTCTTC	
Periferina neo		
Per neo sense	TGTCAAGACCGACCTGTCCG	62ºC
Per neo anti-sense	CCAACCCGCTATGTCCTGATAGCGGT	
Rag2		
Rag2-1	TTAATTCAACCAGGCTTCTCACTT	55ºC
Rag2-3	GCCTGCTTATTGTCTCCTGGTATG	
Neo-3'	CCAACCCGCTATGTCCTGATAGCGGT	

**Taula 5.-** Encebadors utilitzats pels diferents genotipats amb la temperatura d'hibridació per a cadascun d'ells.

Els encebadors es van reconstituir amb el tampó TE (10mM Tris (1.083.820.500, Merck)+ 1mM EDTA (1.08417.0250, Merck), ajustat a pH 8) a una concentració final de 100 µM.

La reacció d'amplificació (PCR) per a un volum final de 25µl es va preparar amb els següents components:

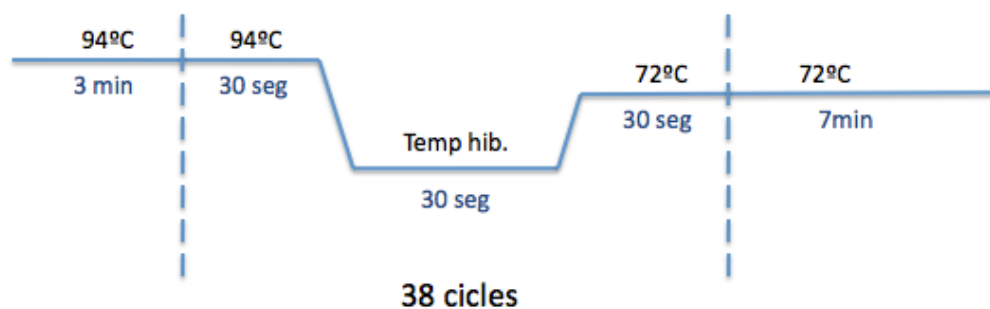
Volum	Reactiu
2,5µl	10X buffer MgCl <sub>2</sub> free (20.035, Biotools)
2,5µl	2 mM dNTPs (20.031, Biotools)
2,5µl	15mM MgCl (20.036, Biotools)
2,5µl	Primers R (5µM)
2,5µl	Primers F (5µM)
2,5µl	Sobrenadant de DNA diluït 1:10
0,25µl	Polimerasa (10.012 , Biotools)
9,75µl	H <sub>2</sub> O destil·lada

**Taula 6.-** Composició de la reacció d'amplificació per PCR.

Aquest protocol va patir variacions en els casos de la reacció d'amplificació del gen Rag2 i en el gen de la periferina mutats. Així, la reacció per amplificar els gens de Rag2, es van afegir 2,5µl de cadascun dels primers, i es va ajustar el volum final de la reacció a 25µl amb 7,25µl d'aigua destil·lada per mostra. En el cas de l'amplificació del gen periferina neo, es va incrementar la concentració de MgCl. Per aquestes mostres es van utilitzar 2,5µl de MgCl a una concentració de 20mM.

Es van dipositar les reaccions de PCR en l'aparell termociclador (PTC-200 peltier thermal cycler, MJ Research).

Totes les reaccions van seguir el mateix cicle: Una primera etapa de desnaturalització inicial de 3 minuts a 94°C. Després 3 etapes que es van repetir 38 vegades per tal d'amplificar els segments. La primera, una etapa de desnaturalització de 94°C durant 30 segons, a continuació, una etapa d'hibridació on la temperatura d'hibridació depèn de la composició dels primers de 30 segons (temperatura reflectida a la taula 5), i finalment, una etapa d'elongació de 30 segons a 72°C. En última instància, es va dur a terme una etapa d'elongació final a 72°C durant 7 minuts (Figura 6).



**Figura 6.-** Esquema del canvi de temperatures en de la reacció de PCR

A continuació, es va preparar un gel de l'1% d'agarosa (20012, Biotools) en TBE buffer (89mM Tris (1.083.820.500, Merck), 89mM àcid bòric (B6768-500G, Sigma-aldrich) i 2mM EDTA ajustat a pH 8,4) i 0,5% syber safer (S33102, Invitrogen). Aquest últim reactiu s'intercala a l'ADN i permet observar l'amplímer d'ADN quan el gel s'il·lumina amb llum ultraviolada. Un cop finalitzada la reacció d'amplificació es van mesclar 25µl del producte de la PCR amb 5µl de tampó de càrrega 6X i es van carregar en els pous del gel d'agarosa. En el primer pou del gel d'agarosa es va carregar 5 µl de marcador de 1Kb (31.005, Biotools) amb tampó de càrrega 6x. Finalment, es va visualitzar el gel amb una làmpada de llum UV.

Composició de 50mL de tampó de càrrega 6x:

Quantitat	Reactiu	Referència
7,5 g	Ficoll-400	43709, VWR
15mg	Blau bromophenol	B5525-10G, Sigma
15mg	Xilè cianol	A497.0010, AppliChem
5mL	0,5M EDTA pH 8.0	1.08417.0250, Merck
5mL	100mM Tris pH 7.5	1.083.820.500, Merck
Ajustat a 50mL amb aigua MiliQ		

**Taula 7.- Composició del tampó de càrrega**

## **2.- Obtenció de mostres i tincions**

Els teixits estudiats en aquest treball van ser el pàncrees, la melsa, les plaques de Peyer i els ganglis raquídis. A causa de la naturalesa dels ganglis, aquests van requerir un processament especial que es descriu en un apartat diferent.

L'anàlisi histològic del pàncrees tenia com a objectiu analitzar l'evolució de l'infiltrat inflamatori present en els illots de Langerhans, en el decurs de la fase subclínica de la malaltia. Per la seva banda, les tincions per immunofluorescència d'aquest mateix teixit es van realitzar per analitzar la distribució dels limfòcits en l'infiltrat als illots. Respecte a la melsa, les tincions van permetre analitzar la distribució dels limfòcits B en els fol·licles limfòides (Zona B).

### **2.1. Obtenció de sèrum**

Per obtenir el sèrum dels animals, es van sacrificar els animals per dislocació cervical i es va punxar amb una agulla de 25G, a la zona esquerra de la cavitat toràcica, on es localitza el cor, i es va extreure la sang aspirant amb una xeringa. La sang extreta es va dipositar en un tub eppendorf i es va deixar coagular a temperatura ambient durant 10 minuts. Transcorregut aquest temps es va centrifugar a 15000xg durant 10 minuts. El resultat final van ser dues fases: el pellet format pel coàgul de sang i el sèrum que formava el sobrenedant. Es va recollir el sobrenedant amb cura per no mesclar les dues fases, i es va congelar a -70°C fins al moment de la seva utilització.

## **2.2. Congelació dels òrgans**

Previ a la congelació d'òrgans, es va preparar un recipient amb isopentà (24872.298, VWR), es va introduir en un bany d'acetona (1.00014.1000, Merck) i neu carbònica. Seguidament, es van sacrificar els ratolins per dislocació cervical i es va realitzar una incisió al llarg de la línia mitja de l'animal (laparoscòpia), per deixar al descobert la cavitat abdominal de l'animal. A continuació, es va extreure la melsa, el pàncrees de l'animal i part del cec i l'ilí, les zones on es localitzen les plaques de Peyer. Immediatament es van submergir els òrgans durant 5 minuts en isopentà. Transcorregut aquest temps, les mostres van ser guardades al congelador de -70°C fins al moment de la seva utilització.

## **2.3. Obtenció de crioseccions**

Els òrgans congelats es van recuperar i es van dipositar en cubs de plàstic amb *Tissue freezing medium* (TFM) (72592-C,TBS) i es van deixar durant 5 minuts a -70°C per tal que el TFM solidifiqués i formés un bloc massís amb l'òrgan a l'interior. Es va col·locar el bloc al crisostat Leica CM1900 de Leica Microsistemas, s.a. i es va procedir a fer crioseccions de 6-8 µm de gruix. Les crioseccions es van recollir en portes diferents segons la finalitat del teixit. Les crioseccions destinades a tincions per hematoxilina-eosina van ser recollides amb portes esmerilats (ECN631-1551,VWR). D'altra banda, les crioseccions destinades a tincions per immunofluorescència van ser recollides amb portes multispot (pH-005, Hendley-Essex). Els dos tipus de mostres portes es van conservar a -70°C fins al moment de la seva utilització.

## **2.4. Tinció histològica mitjançant hematoxilina-eosina.**

Les tincions histològiques mitjançant hematoxilina-eosina es van realitzar en crioseccions de pàncrees procedents de ratolins de diferents edats per tal d'observar l'evolució de l'infiltrat leucocitari.

Les crioseccions de pàncrees van ser sotmeses a la següent bateria de tincions: Primer es van submergir en un bany d'hematoxilina (3519455, VWR) durant 2 minuts. Seguidament, es van submergir en un bany d'aigua de l'aixeta per tal de treure l'excés d'hematoxilina. Després es van submergir en un bany amb eosina (341972Q, VWR) durant 30 segons. A continuació es van sotmetre els portes a una deshidratació progressiva d'etanol (141086.1214, Panreac) i xilè (28975.325, VWR): Primer es van submergir 10 segons en un bany d'etanol 70%; a continuació, 10 segons en un bany d'etanol 95%, i per últim, en un bany d'etanol 100% durant 2

minuts. Finalment, es van submergir les mostres en una cubeta amb xilè durant 1 minut (Taula 8).

Reactiu	Temps
Hematoxilina	2 minuts
Aigua	-
Eosina	30 segons
Etanol 70	30 segons
Etanol 95	30 segons
Etanol 100	2 minuts
Xilè	1 minut

**Taula 8.-** Bateria de reactius i els temps respectius.

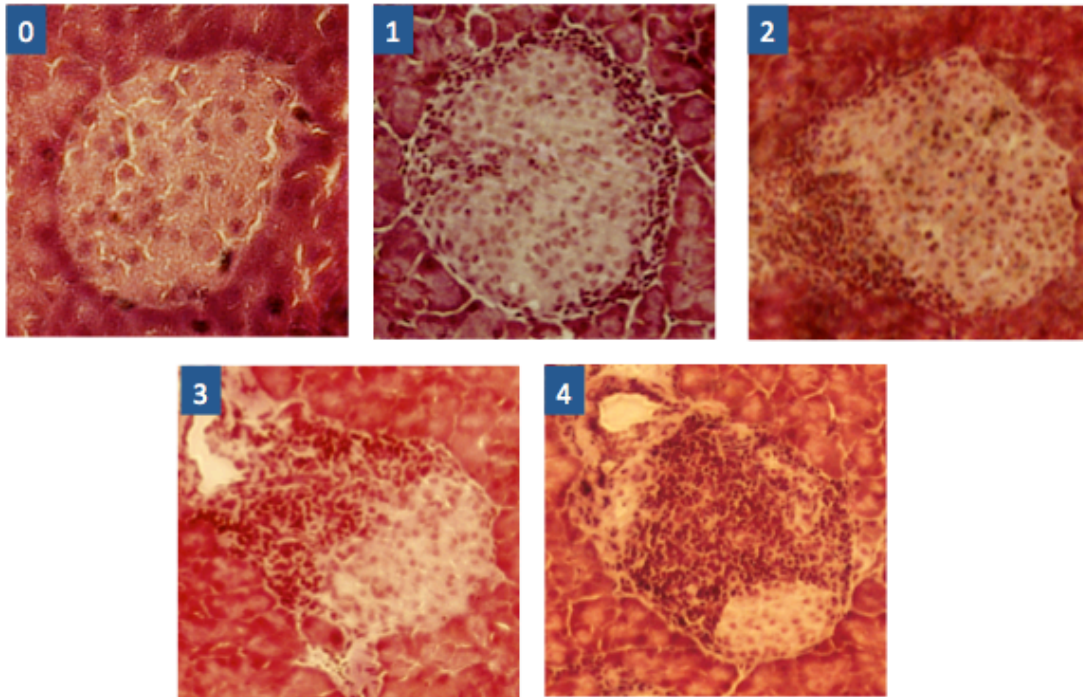
Un cop acabada la tinció es va afegir medi de muntatge DPX (360294H, BDH Prolabo), es va repartir homogèniament pel portaobjectes i es va cobrir amb un cobreobjectes. Es va deixar assecar 16 hores sota la campana d'extracció de gasos, abans de fer l'avaluació de la infiltració leucocitària.

## 2.5. Avaluació de la infiltració leucocitària

Per tal de poder avaluar el grau d'infiltració leucocitària que presentaven les diferents soques, es va determinar un valor d'infiltració (*insulitis score*). D'aquesta manera es van poder tenir uns resultats estandarditzats i comparables entre soques.

Es van estudiar entre 20 i 30 illots per ratolí, i a cada illot se li va donar un grau d'infiltració de 0 a 4 seguint el criteri següent:

Grau 0 illot no infiltrat; grau 1 peri-insulitis, cèl·lules infiltrants al contorn de l'illot; grau 2 insulitis lleu, menys d'un 25% de l'illot està infiltrat; grau 3 insulitis moderada, infiltració entre 25%-75% de la superfície de l'illot; grau 4 insulitis severa, més del 75% de l'illot està infiltrat (Figura 7).



**Figura 7.-** Imatge dels diferents graus d'infiltració leucocitària dels illots pancreàtics.

L'estudi va ser a doble cec, sense saber ni l'edat ni la soca de l'animal que s'estava avaluant. Per obtenir el valor d'infiltració (*insulitis score*) es va utilitzar la següent fórmula:

$$\text{Insulitis score} = \frac{(0 \times A) + (1 \times B) + (2 \times C) + (3 \times D) + (4 \times E)}{\text{num. illots}}$$

On els nombres del 0 al 4 corresponen als graus d'infiltració, i les lletres de l'A a l'E corresponen al nombre d'illots en cada grau (un nombre d'illots A amb grau d'infiltració 0 i així successivament per les lletres i els números).

## 2.6. Tinció dels teixits mitjançant immunofluorescència

Les tincions histològiques mitjançant immunofluorescència tenien com a objectiu estudiar la distribució dels limfòcits B, tant en la melsa com en els illots pancreàtics.

Primerament, es van recuperar les crioseccions i es van deixar temperar durant 15

minuts. Seguidament es van submergir en un bany de PBS 1X (L1835, Biochrom) durant 10 minuts. Es van permeabilitzar les mostres durant 30 minuts en una cubeta en agitació que contenia PBS+ tween20 (28829.193,VWR). A continuació es van rentar en agitació durant 15 minuts en un bany de PBS 1X. Les crioseccions es van bloquejar durant 2 hores en una cubeta en agitació que contenia PBS+Tween20+2%BSA (23209, Thermo Scientific). Finalment es va fer un rentat de 15 min en PBS previ a la incubació amb els anticossos primaris. Es van incubar les mostres amb els anticossos overnight (16 hores) en una cambra humida. Transcorregut aquest temps, els portes es van sotmetre a un rentat ràpid amb PBS 1X i a un bany de PBS 1X de 20 minuts. Posteriorment es van incubar els anticossos secundaris durant 2 hores a temperatura ambient. Un cop finalitzada la incubació els portes van ser sotmesos a un bany de PBS 1X de 20 minuts. Per acabar, es va afegir una gota de medi de muntatge amb marcador de DAPI (P36935, Invitrogen).

Es van observar el microscopi confocal FV-10I d'Olympus, les imatges es van analitzar amb el programa FV10-AS3.1 d'Olympus.

Els anticossos utilitzats per la immunofluorescència van ser els descrits a la taula següent:

Anticòs	Referència	Dil·lució de treball
Anti-CD45/B220	561876, BD	1:100
Anti-CD3-FITC	HM3401,Invitrogen	1:100
Anti-IgMa-biotina	553515, BD	1:100
Anti-IgMb-biotina	553519, BD	1:100
Anti-Substancia p	Ab10252, abcam	1:10
Anti-periferina	SC-7604, santa Cruz Biotechnology	1:200
Anti-goat -FITC	554001, BD	1:1000
Anti-Insulina	A0569, Dako	1:500
Anti-guinea pig TritC	55389, ICN Biomedicals	1:1000

**Taula 9.-** Llistat dels anticossos utilitzats i les dil·lucions de treball emprades.

## 2.7. Obtenció dels ganglis raquidis i tincions

A diferència de l'extracció de la resta d'òrgans, els ganglis van requerir una fixació prèvia i una manipulació molt curosa per evitar danyar el teixit.

### 2.7.1. Fixació dels animals

Els animals van ser fixats mitjançant la perfusió. Aquest mètode es serveix del sistema circulatori de l'animal per tal de poder difondre l'agent fixador, paraformaldehid, per tot l'organisme i afavorir, d'aquesta manera, una millor fixació.

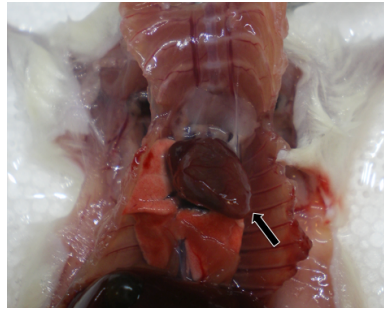
Primerament, l'animal van ser anestesiats amb una injecció intraperitoneal de pentobarbital sòdic (Dolethal, Vétoquinol). Un cop adormit, es va subjectar en un suport i es va fer una incisió al llarg de la línia mitja de l'animal, per deixar al descobert la cavitat abdominal i toràcica. Seguidament, es van apartar les vísceres de la cavitat abdominal a un costat per tal de poder accedir al diafragma. Es va fer una incisió al diafragma del ratolí i a banda i banda de l'estèrnum, per tal de deixar al descobert la cavitat toràcica.

Un cop oberta la cavitat toràcica, es va fer un tall a l'aurícula dreta de l'animal i es va punxar el ventricle esquerre amb una agulla de 23G. Es va introduir l'agulla en un angle de 45° amb cura de no travessar l'envà que separa el ventricle esquerre del dret (Figura 8). Es va injectar sèrum fisiològic (0,9% NaCl (1.06404.1000, Merck) en aigua destil·lada) per tal substituir la sang pel sèrum i netejar el sistema circulatori de l'animal, i així afavorir a la posterior fixació de l'animal. D'aquesta manera, el sèrum entra pel ventricle dret, passa a través del sistema circulatori i finalment surt per l'aurícula dreta. En el moment que el flux que sortia per l'aurícula va ser transparent, es va procedir a la fixació de l'animal. Amb molt de compte, es va canviar la xeringa i es va injectar el paraformaldehid 4% en tampó fosfat 0,1M (TF) ajustat a pH7,4 (Taula 10). Quan la musculatura de l'animal va ser rígida es va parar la fixació. La perfusió de l'animal es va realitzar sota campana d'extracció de gasos, per tal d'evitar l'inhalació amb el paraformaldehid.

Reactiu	Referència
53,39g fosfat dissòdic	1.06580.1000, Merck
13,79g fosfat monosòdic	1.06346.1000, Merck

**Taula 10.- Composició del tampó fosfat per a 2L.**

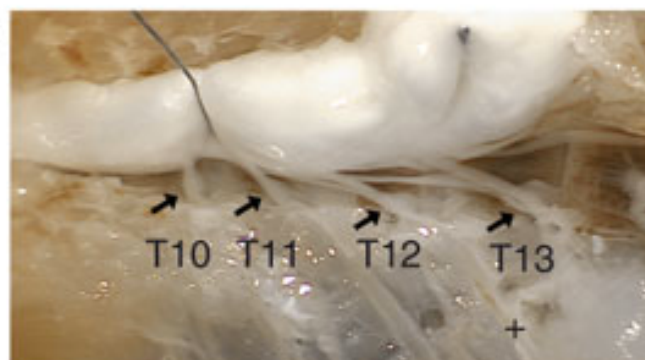




**Figura 8.-** Detall de la cavitat toràctica d'un ratolí. La fletxa negra indica el punt i l'angle amb el qual s'insereix l'agulla per realitzar la perfusió.

### **2.7.2. Extracció dels ganglis raquidis**

Un cop fixat l'animal, es va col·locar aquest sota la lupa binocular per poder treballar amb major precisió (Figura 9). Es va retirar la pell de la part dorsal de l'animal per deixar al descobert la part muscular i esquelètica de la columna vertebral. A continuació, es va retirar part de la musculatura que cobria la part dels lloms paraventrals. Amb molta cura per no danyar els nervis, es van retirar les vèrtebres per deixar a la vista la medul·la òssia, els nervis aferents i eferents dels GR. Es va utilitzar l'última costella com a referència per a la identificació i extracció dels ganglis. El gangli T13 es troba situat en posició caudal a l'última costella, com s'indica a la figura 8 amb un símbol (+). Finalment, i amb molt de compte, es van retirar els ganglis i es van conservar en 4% paraformaldehid a 4°C fins al moment del seu processament.



**Figura 9.-** Identificació dels ganglis raquidis toràcics del número 10 al 13. Imatge extreta de l'article publicat per B Sacha et al. *Nature Protocols* (2007)<sup>213</sup>.

### **2.7.3. Criopreservació i crioseccions dels ganglis.**

Els ganglis que van ser utilitzats per a immunofluorescència van ser criopreservats i tallats al criostat. Un cop extrets, es van conservar un màxim de 24 hores en 4% paraformaldehid (28794.295,VWR) a 4°C. Transcorregut aquest temps, es va canviar el paraformaldehid per sucrosa al 30% (S0389, Sigma) en TF per tal de poder criopreservar els ganglis. Es van mantenir els ganglis en sucrosa durant un mínim de 3 dies, transcorregut aquest temps els ganglis ja estaven criopreservats i a punt per ser processats.

Per a la criosecció dels ganglis, es va crear un bloc de TFM, i amb l'ajuda d'un pinzell prim es van col·locar els ganglis sobre el bloc. A continuació, es va dipositar una gota de TFM fresc i es va deixar solidificar durant 5 minuts a la cambra del propi criostat (-20°C). Un cop solidificat el TFM es va col·locar el bloc al criostat i es va procedir a fer les crioseccions de 6-8 µm de gruix. Les seccions es van recollir en portes multispot per a realitzar les tincions d'immunofluorescència.

### **2.7.4. Inclusió en parafina**

A diferència de la resta de teixits, una part dels ganglis van ser sotmesa a una inclusió en parafina.

Amb aquest objectiu, primerament es van recuperar els ganglis i es van fer dos rentats amb tampó fosfat 0,1M de 10 minuts. A continuació es van submergir en etanol 70% durant 30 minuts. Per tal de poder visualitzar millor els ganglis durant el procés d'inclusió en parafina es van sotmetre en un bany d'eosina alcohòlica (0,5g d'eosina en 1L d'etanol 95%) durant 15 minuts. Seguidament, es va passar a la deshidratació dels ganglis. Primer es van submergir en dos rentats de 30 minuts d'etanol 96%, a continuació, tres rentats d'etanol 100 de 30 minuts, i finalment, tres rentats de 15 minuts de xilè. Un cop deshidratats els teixits es van deixar en un bany de parafina líquida (50°C) durant 2 hores per tal d'incloure el teixit en parafina. Transcorregut aquest temps vàrem dipositar els ganglis en un cassette amb parafina i els vam deixar solidificar (16 hores).

Es va col·locar el cassette al microtom Leica RM2135 i es van realitzar talls dels ganglis de 12µm de gruix. Es van recollir amb portaobjectes que havien estat prèviament impregnats amb una capa fina de gelatina (24350.262,VWR). En recollir les seccions es va dipositar una gota d'aigua sobre el portaobjectes per tal que el teixit quedés estès al portaobjectes. Es van deixar assecar els portes en una placa metàl·lica a 40°C durant 16 hores

### 2.7.5. Tincions hematoxilina-eosina

Abans de començar la tinció de les seccions dels ganglis es van deixar durant 10 minuts en una estufa a 60°C per tal de desfer la parafina i facilitar la tinció. A continuació, es van sotmetre a una bateria de rehidratació, després es van tenyir i finalment es van tornar a deshidratar per tal de conservar les mostres (Taula 11).

Els portes es van sotmetre a dos rentats de xilè durant 10 minuts, a continuació es van sotmetre a una bateria d'alcohols de 100%, 95% i 60%, els portes es van estar en dos banys de 5 minuts en cada un dels alcohols. Finalment, es va dipositar en un bany amb aigua destil·lada de 10 minuts.

Un cop hidratat el teixit es van submergir els portes amb hematoxilina durant 23 minuts. Seguidament es va fer un rentat amb aigua destil·lada per treure l'excés d'hematoxilina, a continuació es va submergir els portaobjectes 10 vegades en alcohol àcid (280mL d'etanol 80% + 3mL HCL al 37%). Previ a la tinció d'eosina es van deixar les mostres dels ganglis durant 10 minuts amb aigua corrent. Transcorregut aquest temps es van tenyir durant 1 minut i 30 segons amb eosina. Després es van fer dos rentats amb etanol, el primer amb etanol 70% i el segon amb etanol 96%. A continuació es van sotmetre en un bany d'etanol 96 durant 30 segons, i a dos banys de 5 minuts d'etanol 100. Finalment, es van fer 3 banys de xilè de 5 minuts, es van montar els portes amb DPX i es van cobrir amb els cobreobjectes.

Reactiu	Temps	Repeticions
Xilè	10 minuts	2
EtOH 100	5 minuts	2
EtOH 96	5 minuts	2
EtOH 70	5 minuts	2
H2O	10 minuts	-
Hematoxilina	23 minuts	-
H2O	20 segons	-
Alcohol àcid	10 immersions	-
Aigua corrent	10 minuts	-
Eosina	1 minut 30 segons	-
EtOH 70	20 segons	-
EtOH96	20 segons	-
EtOH 100	5 minuts	2
Xilè	5 minuts	3

**Taula 11.- Esquema del procés de tinció dels ganglis inclosos en parafina.**

### **2.7.6. Talls semifins i microscòpia electrònica.**

El processament dels ganglis per a talls semifins i ultrafins van ser duts a terme al servei de microscopia de la universitat de Lleida.

Després de la fixació amb paraformaldehid, els ganglis van ser fixats amb 2,5% glutaraldehid en 0'1M tampó fosfat pH 7.4 durant 24 hores. A continuació van ser postfixats amb 1% tetròxid d'osmi durant 2 hores. Les mostres van ser incloses en medi Embed 812 (Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA) a partir del qual es van fer seccions semifines (1µm de gruix). Aquestes es van observar amb el microscopi òptic després de ser tenyides amb blau de toluidina.

Per la microscòpia electrònica es van fer seccions ultraprimes de les àrees seleccionades dels blocs prèviament incluits en el medi Embed 812 i es van tenyir amb acetat d'uranil i citrat de plom. Les seccions es van observar amb el microscopi Electronic Zeiss EM 910 (Oberkochen, Alemanya)

### **2.7.7. Tinció dels ganglis mitjançant immunofluorescència.**

Els portes amb els ganglis que es van tenyir mitjançant immunofluorescència es van sotmetre al mateix procediment que per la melsa i el pàncrees, descrit a l'apartat 2.6. Els anticossos utilitzats van ser els que es descriuen a la taula 12.

Anticòs	Referència	Dil·lució de treball
Anti-CD3 FITC	HM3401, Invitrogen	1:100
Anti-IgMa biotina	553515, BD	1:100
Anti-CD11b APC	553312, BD	1:100
Anti- Substancia P	Ab10353, abcam	1:10
Streptavidina- APC	554067, BD	1:600
Anti-guinea pig- TritC	55389, ICN Biomedicals	1:1000

**Taula 12.-** Anticossos utilitzats per les tincions d'immunofluorescència dels ganglis.

### 3.-Western blot

Es va utilitzar la tècnica del western blot per tal de confirmar que l'animal transgènic 280.IgH.NOD era capaç de secretar a la sang anticossos que reconeixien la periferina. Es va utilitzar aquesta tècnica pel fet que augmenta la sensibilitat en comparació la immunofluorescència.

#### **3.1. Preparació de les mostres**

Per tal de confirmar el reconeixement dels anticossos presents al sèrum es va utilitzar una proteïna recombinant generada en el nostre laboratori que contenia la regió carboxiterminal de la periferina (PRPH 429-507) on es troba l'epítot reconegut per la immunoglobulina que reconeix l'hibridoma a partir de la qual es van clonar les regions variables dels gens de les Igs que es van utilitzar per generar el transgènic 280.IgH.IgL.NOD. La proteïna recombinant portava una cua d'histidines que es va utilitzar per purificar-la i reconèixer-la en la membrana de nitrocel·lulosa. La proteïna es trobava a una concentració de 0,33 µg/µl.

Es va preparar mostra per a carregar 4 carrils. Es va mesclar: 48 µl d'aigua destil·lada; 12 µl de proteïna recombinant; 8 µl d'agent reductor (Nupage Sample Reducing agent 10X. NP004, Invitrogen) i 16 µl de tampó de càrrega (Nupage LDS Sample Buffer 4X. NP007, Invitrogen).

La mostra es va mantenir durant 3 minuts a 95°C per tal de desnaturalitzar la proteïna. Transcorregut aquest temps es va mantenir la mostra en gel fins al moment de carregar-la en el gel de poliacrilamida.

#### **3.2. Electroforesis en gels de poliacrilamida**

Per realitzar l'electroforesis de proteïnes es van utilitzar gels de poliacrilamida comercial del tipus Nupage Novex 4-12% Bis-Tris Gel de 12 pous (NP0321, Invitrogen). Aquests gels estan compostos per un gradient creixent de poliacrilamida que va del 4 al 12% que permeten separar un gran ventall de proteïnes.

El gel de poliacrilamida es van muntar en una cubeta d'electroforesis X Cell Surelock Mini-cell (EI001, Invitrogen). Aquest sistema està pensat per córrer dos gels a poliacrilamida alhora, com que en aquest cas, amb un gel era suficient per corre les mostres, es va utilitzar un motlle de plàstic que tenia la mateixa forma que el gel. D'aquesta manera, un cop muntat es creava una cel·la interna entre els dos gels i una externa. La cel·la externa es va omplir amb 250mL de tampó MOPS-

SDS 1X (*NuPage Running Buffer* 20X, NP0001, Invitrogen) i la cel·la interna es va omplir amb 200mL de buffer MOPS-SDS 1X al que se li van afegir 0,5mL agents antioxidants (Nupage Antioxidant, NP0005, Invitrogen).

Un cop muntada la cubeta d'electroforesis amb els gels i els tampons, es van carregar 20µl de la preparació proteica a cada un dels pous. En un dels pous s'hi va carregar 8 µl de marcador de pes molecular SeeBlue Plus II pre-Stained Standard (LC5925, invitrogen). Finalment, es va col·locar la tapa de la cubeta i es va connectar a la font de voltatge (Standard Power Packd P25, 040-800, Biometra) que permetia ajustar el voltatge constatat a 180V. Es va administrar corrent durant 50 minuts fins a completar la separació de les proteïnes al llarg del gel.

### **3.3. Transferència a la membrana de nitrocel·lulosa**

Finalitzada la migració de proteïnes a través del gel de poliacrilamida, les proteïnes van ser transferides a una membrana de nitrocel·lulosa (Hybond ECL, RPN 3030, Amersham) (Figura 10) per tal de poder fer posteriorment la detecció immunohistoquímica sobre aquesta última.

Es va retallar la membrana de nitrocel·lulosa coincidint amb les dimensions del gel de poliacrilamida 7x8 cm. Abans de començar la transferència es va hidratar la membrana amb aigua destil·lada i es va equilibrar durant 10 minuts amb 30mL de tampó de transferència compost de 5% de tampó de transferència (NP0006, Transfer buffer 20X, Invitrogen), 10% metanol (20846.326, VWR) i 0'1% d'antioxidant.

Es van col·locar 5 papers secants (Blot Papers GB002,10426693, Schleicher-schuell), previament retallats a la mida de la membrana (7x8cm) i humitejats amb el tampó de transferència, apilats un sobre l'altre. Es va col·locar la membrana de nitrocel·lulosa a sobre el bloc de papers i a sobre d'aquesta el gel de poliacrilamida. Damunt del gel es van col·locar 5 papers secants més.

Després d'eliminar les possibles bombolles d'aire que podien haver quedat entre les diferents capes del bloc, es va col·locar tot el bloc de transferència a l'aparell Novex® Semi-Dry Blotter d'Invitrogen, de manera que l'elèctrode negatiu quedava a sota la membrana i el positiu per sobre el gel. Al accionar el corrent les proteïnes migren cap a l'ànode i queden retingudes a la membrana de nitrocel·lulosa. Es va connectar l'aparell de transferència a la font de voltatge que es va mantenir a un amperatge constant de 280mA durant 30 minuts.



**Figura 10.-** Esquema del bloc de transferència.

En finalitzar la transferència es va desmuntar el bloc i es va comprovar que la transferència s'havia realitzat correctament mitjançant l'observació de les bandes del marcador a la superfície de la membrana i no en el gel de poliacrilamida. A més a més, es va realitzar una tinció amb Ponceau S. per assegurar que la mostra també s'havia transferit correctament.

Es va incubar la membrana durant 5 minuts amb una solució 0,5% Ponceau S. (3504, Sigma) en 1% d'àcid acètic (1.00063.1011, Merck), a temperatura ambient. Després es va destenyir amb aigua destil·lada durant 2 minuts. Tot i que la detecció amb Ponceau no és gaire sensible (de l'ordre de micrograms de proteïnes) va permetre observar les mostres. Aquesta tinció té l'avantatge que no altera les proteïnes anclades a la membrana i és compatible amb la tinció immunoquímica.

Aprofitant la tinció amb Ponceau, es van fer petites marques amb llapis a la part superior i inferior de la membrana que delimitaven els diferents carrils de la mostra. Aquestes marques van servir com a referència per tallar la membrana a posteriori.

### 3.4. Detecció immunoquímica

Previ a la incubació de la membrana amb anticossos, va ser necessari bloquejar la membrana per tal d'evitar la unió inespecífica dels anticossos. Es va incubar la membrana durant dues hores, a temperatura ambient i en agitació, amb un tampó de bloqueig que contenia un 2,5% de llet desnatada (Sveltesse, Nestlé) i 0,2% de Tween-20 (P7949, Sigma) en PBS 1X. Després d'aquesta incubació, es va retirar l'excés de tampó de bloqueig mitjançant dos rentats de 5 minuts amb un tampó de rentat (0,1 % Tween-20 en PBS).

Utilitzant les marques realitzades anteriorment, es va retallar la membrana de nitrocel·lulosa amb diferents tires (cada tira corresponia a un dels pous del gel

d'acrilamida). Es van incubar cada una de les tires amb un anticòs diferent. Els anticossos, tant l'anticòs comercial com els sèrums dels animals van ser dil·luïts amb un tampó a l'1% de llet desnatada i 0,1% de Tween 20 en PBS. Els sèrums dels animals van ser utilitzats a una dilució 1:10, mentre que l'anticòs comercial que reaccionava contra la cua d'histidines (Histidine tag, 372900, Invitrogen) es va utilitzar a 1:200. Cada tira es va incubar amb 1mL de la dilució d'anticòs durant 16 hores (overnight) a 4°C i en una agitació suau i contínua.

Transcorregut el temps d'incubació es van realitzar una serie de 4 rentats de 5 minuts amb tampó de rentat (0,1% Tween en PBS) per tal d'eliminar l'excés d'anticòs que no s'havia unit a la proteïna. Es van incubar les tires amb 1mL d'una dilució 1:1000 d'anticòs secundari marcat amb peroxidasa, que reconeixia les immunoglobulines de ratolí (goat anti-mouse HRP, 554002, BD Biosciences), en tampó descrit per a la primera incubació (1% de llet desnatada i 0,1% de Tween 20 en PBS ) durant 1 hora a temperatura ambient i en agitació. Després, per treure l'excés d'anticòs secundari, es van realitzar una serie de 4 rentats de 5 minuts amb PBS.

Els westerns blots van ser revelats mitjançant quimioluminiscència. Per preparar la reacció quimioluminescent es van mesclar volums iguals dels reactius *Stable Peroxide* i *Luminol/Enhancer Solution* (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, 34079, Pierce). Es va dipositar la preparació uniformement sobre la membrana, després d'assecar el PBS de l'últim rentat, i es va deixar actuar la reacció durant 5 minuts. Finalment, es va retirar l'excés de reactiu luminescent i es van col·locar les tires en un cassette d'autoradiografia, cobertes per un film de plàstic.

A la cambra fosca, es van exposar les membranes als films d'autoradiografia (Hyperfilm ECL, RPN 2103 K, Amersham), durant diferents temps d'exposició (30 segons, 1 minut, 2 minuts), per acabar, van ser revelades utilitzant l'aparell OPTimax X-ray film processor (Protec medical system).



## 4.- Citometria

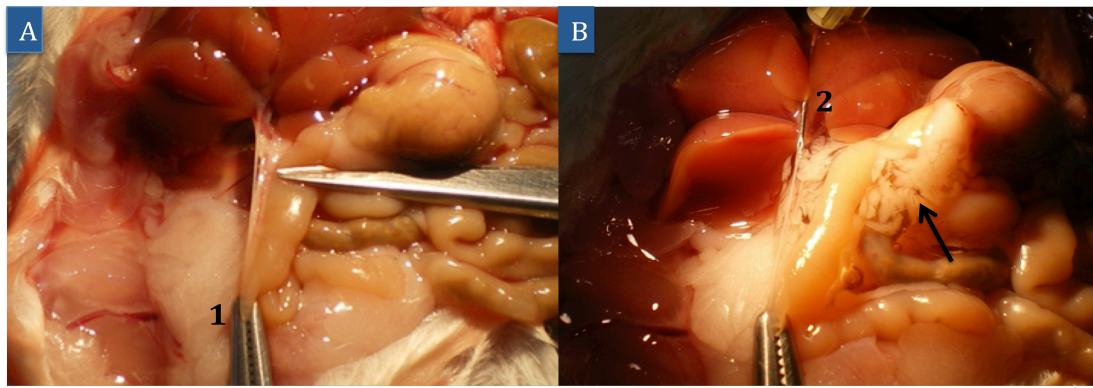
### **4.1. Obtenció de suspensions cel·lulars**

Per poder analitzar l'expressió d'antígens de superfície cel·lular en diferents poblacions cel·lulars mitjançant citometria de flux, va ser necessari disposar d'una suspensió de cèl·lules representativa de cada mostra. Amb aquest propòsit, es van seguir diferents protocols per l'obtenció de les suspensions cel·lulars, segons l'òrgan d'origen (pàncreas, melsa, plaques de peyer i limfòcits intraperitoneals).

#### ***4.1.1. Obtenció de limfòcits infiltrants a illots pancreàtics.***

Per tal de poder analitzar els limfòcits infiltrants als illots, primerament es van haver d'aïllar els illots pancreàtics del teixit exocrí i després, disgregar-los per obtenir els limfòcits infiltrants en el seu interior. L'aïllament dels illots es va realitzar mitjançant digestió amb col·lagenasa. Aquest enzim permet eliminar gran part del teixit exocrí i conservar l'estructura de l'illot. A més, la col·lagenasa té menys efecte proteolític sobre les proteïnes que es troben a la superfície cel·lular, fet que és essencial pel posterior anàlisi de marcadors de superfície. Es va utilitzar la col·lagenasa tipus IV (CLS-4, Whortington) a una concentració equivalent a 470U/mL, dissolta en HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution* 10X, 14060-040, GibcoBrl;+ 0'35gr/L NaHCO<sub>3</sub>).

Els animals van ser anestesiats i posteriorment sacrificats per dislocació cervical. Seguidament, es va realitzar una incisió longitudinal a la línia mitja de l'animal, des de la part inferior de l'abdomen fins al tòrax. Es van realitzar unes incisions laterals per tal de poder deixar més accessible la zona de treball, també es va apartar la massa intestinal cap al costat esquerre de l'animal per deixar a la vista el colèdoc. A continuació es va localitzar i pinçar l'ampolla de Vater amb una pinça "coger" tipus mosquit, d'aquesta manera s'obturava el pas de líquid cap a l'intestí. Es va subjectar el colèdoc amb unes pinces per manternir-lo tens i es va canul·lar amb una agulla de 30G aprofitant el suport de les pinces per mantenir l'agulla a l'interior del conducte. En el moment de la injecció de la col·lagenasa (freda, 4°C), es va poder comprovar l'èxit de la canul·lació observant com la col·lagenasa es distribuïa pel pàncrees i feia augmentar el volum d'aquest (Figura 11).



**Figura 11.-** Protocol de la canul·lació per injectar la col·lagenasa al pàncrees. **A** Pinçament de l'ampolla de vàter (1) a la unió del colèdoc amb l'intestí prim. **B** Injecció de col·lagenasa a la part superior del colèdoc (2). La fletxa assenyalava el detall del pàncrees dilatat després de la injecció de col·lagenasa.

Després d'injectar la colagenasa es va extreure el pàncrees, evitant la grassa adjacent ja que dificulta la posterior digestió, i es va dipositar en un tub Falcon de 50mL per realitzar la digestió. La digestió es va realitzar en un bany a 37°C durant 30 minuts, transcorregut aquest temps es va parar la digestió afegint 15mL de HBSS fred. A continuació, el teixit va ser disgregat mecànicament amb una pipeta pasteur de 10mL fins a obtenir una suspensió homogènia. Es va deixar sedimentar la suspensió durant 2 minuts, per tal que els illots es dipositessin al fons del tub i poder descartar així el sobrenedant que contenia majoritàriament teixit exocrí. El sediment va ser recuperat i passat a una placa de Petri (90mm de diàmetre). A la placa va ser a on es van recollir illots pancreàtics amb una pipeta i amb l'ajuda d'una lupa binocular (0-6.4x, 475057, Zeiss). Mitjançant aquest protocol es van obtenir entre 30-100 illots per pàncrees. Finalment, per obtenir els limfòcits infiltrants als illots per al posterior anàlisi per citometria, es va procedir a la disgregació mecànica dels illots de Langerhans recollits. Per realitzar la disgregació mecànica es va utilitzar la part esmerilada de dos portaobjectes, es va ressuspendre el resultat de la disgregació en 2mL de PBS 1X. Es va deixar sedimentar les restes dels illots i es va utilitzar el sobrenedant, que contenia els limfòcits, per fer les anàlisis per citometria.

#### 4.1.2. Disgregació i hemòlisi de la melsa

Per poder realitzar l'anàlisi citomètric de la mostra procedent de melsa va ser necessari disgregar la melsa per obtenir una suspensió cel·lular. Abans però, es va haver de realitzar un procés d'hemòlisi necessari per eliminar els eritròcits.

La melsa va ser extreta de l'animal i dipositada en una placa de Petri amb 1mL de PBS 1X, amb la part esmerilada de dos portaobjectes es va disgregar fins a tenir una suspensió cel·lular. Es va recollir la suspensió cel·lular en un eppendorf i es va centrifugar (900xg durant 5 minuts), es va decantar el sobrenedant i es va procedir a l'hemòlisi dels eritròcits del pellet. La lisis d'eritròcits es va realitzar mitjançant el xoc osmòtic, aprofitant que aquest tipus cel·lular, degut que la seva naturalesa, són més susceptible a la lisi per osmosi que la resta de poblacions cel·lulars.

D'aquesta manera es va resuspendre el pellet amb 900µl d'aigua destil·lada i immediatament es va afegir 100µl de PBS 10x per reestablir l'osmolaritat. Es va centrifugar la suspensió cel·lular i es va decantar el sobrenedant de color vermellós fruit de la lisis d'eritròcits. Finalment, el pellet cel·lular resultant es va resuspendre amb 1mL de PBS.

#### ***4.1.3. Obtenció i disgregació de les plaques de Peyer***

Els animals van ser sacrificats per dislocació cervical i es va realitzar una incisió longitudinal a la línia mitja de l'animal, des de la part inferior de l'abdomen fins al tòrax. Es va obrir transversalment per tal de poder deixar més accessible la zona abdominal.

Les plaques de Peyer es localitzen fàcilment al cec i a l'ili, al ser agrupacions de teixit limfàtic creen un cúmul de cèl·lules blanques que contrasten amb el color marronós de l'intestí (Figura 12). Un cop identificades aquestes estructures, es van treure amb l'ús d'unes tisores i pinces, i es van dipositar en un tub eppendorf que contenia 500µl de PBS. Es van vortejar repetidament per tal de netejar la mostra de possibles restes de femta. Finalment, es van passar les plaques de Peyer en una placa de Petri on van ser disgregades de la mateixa manera que s'ha descrit en l'apartat de la melsa.



**Figura 12.-** Detall dels intestins d'un ratolí. La fletxa assenyala l'acúmul de teixit limfàtic a la regió del cec.

#### **4.1.4. Obtenció de cèl·lules peritoneals**

Els animals van ser sacrificats per dislocació cervical, i se'ls hi va realitzar una incisió a longitudinal a la línia mitja. La incisió va servir per deixar al descobert la paret muscular; és a dir, a diferència de la resta de protocols utilitzats per extreure òrgans, en aquest cas no deixem al descobert la cavitat abdominal, sinó que només es va retirar la pell. A continuació, es van injectar lentament 10mL de PBS 1X fred a la cavitat abdominal de l'animal amb una xeringa de 25G i es va pressionar amb moviments circulars l'abdomen de l'animal. Seguidament, amb la mateixa xeringa utilitzada, es va retirar el volum de PBS injectat i es va disposar el PBS que contenia les cèl·lules peritoneals en tubs falcons, aquests es van mantenir a 4°C fins al moment de la seva utilització.

#### **4.2. Marcatge d'antígens de superfície.**

El citòmetre usat per analitzar els antígens de superfície de les diferents suspensions cel·lulars va ser el Facs Canto II de BD que es disposa en la unitat de citometria de l'Institut IRBLleida. Aquest citòmetre disposa de 3 làsers, fet que permet la combinació de fins a una combinació de 8 anticossos marcats amb diferents fluorocroms.

Després de realitzar el recompte cel·lular de cada una de les suspensions cel·lulars, es van disposar 200.000 cèl·lules per tub i es van rentar amb 1mL de PBS. Es van centrifugar durant 5 minuts a 900xg i es va descartar el sobrenedant. El pellet cel·lular es va ressuspensar amb 50µl de la barreja d'anticossos primaris desitjada a una dilució 1:100, es van vortejar i mantenir en incubació durant 20 minuts a temperatura ambient i foscor. Transcorregut aquest temps, es va realitzar un rentat amb 1mL de PBS 1X que va servir per eliminar l'excés d'anticòs primari no unit a les cèl·lules. Es va centrifugar la suspensió cel·lular i es va descartar el sobrenedant resultant. En les tincions que només requerien anticossos primaris, es va ressuspensar el pellet cel·lular amb 150 µl de PBS 1X i es va mantenir a 4°C i condicions de foscor fins al moment de l'anàlisi.

Pel que fa als casos que l'anticòs no duia un fluorocrom conjugat, però estava conjugat amb biotina, es va utilitzar estreptavidina marcada amb el fluorocrom APC. El pellet va ser incubat amb estreptavidina a una dilució 1:600 durant 20 minuts a temperatura ambient i en condicions de foscor. Igual que en la primera incubació, la suspensió cel·lular se li va afegir 1mL de PBS 1X per rentar-la i treure l'excés d'estreptavidina no unida. Finalment, es va centrifugar i ressuspensar el pellet cel·lular amb 150µl de PBS, i es va mantenir en condicions de foscor i a 4°C fins al moment de ser analitzats per citometria.

A continuació es detalla els anticossos utilitzats pels diferents estudis:

Anticòs	Referència
CD19-V450	560375, BD
CD3-FITC	HM3401, Invitrogen
CD21-PE	552957, BD
CD23-PE-Cy7	101614, Biolegend
IgMa-biotina	553515, BD
IgMb-biotina	553519, BD
IgDa-FITC	553507, BD
IgDb-FITC	553510, BD
CD5-FITC	553021, BD
CD43-PE	553271, BD
CD1d-PerCP-Cy5.5	123514, Biolegend
CD24-FITC	553261, BD
CD80-biotina	553767, BD
CD86-PE	553692, BD
H2kd-biotina	553563, BD
I-A <sup>k</sup> -biotina	553539, BD
IgMa -PE	553517, BD
Streptavidina- APC	554067, BD
Isotip Ig2ab FITC	11-4732-71, ebioscience

**Taula 13.-** Llistat d'anticossos utilitzats pels estudis de citometria.

### 4.3. Comptatge dels nobres absoluts

En els casos que es volia saber el nombre absolut de cèl·lules d'una determinada població és va utilitzar el producte PERFECT-COUNT Microspheres™ (CYT-PCM-50, Cytognos). Aquest producte està format per dos tipus de microesferes de mida petita (menor que les cèl·lules) que emeten fluorescència a diferents longituds d'ona. A cada tub de citometria s'hi afegeix 2µl d'aquest producte. La següent fórmula permet determinar la quantitat de cèl·lules d'una determinada subpoblació.

$$\text{Nombre absolut (cel/}\mu\text{l)} = \frac{\text{Nombre de cèl·lules de la subpoblació comptades}}{\text{Nombre de mircoesferes comptades}} \times \text{Número Perfect Count/}\mu\text{l}$$

(valor depenent del lot)

#### **4.4. Anàlisis dels resultats**

Les dades obtingudes amb el citòmetre Facs Canto II de BD van ser analitzades amb el programa FACSDiva software 6.1.3 de BD.

### **5.- Estudis *in vitro*: Proliferació cel·lular**

Per dur a terme els estudis de proliferació cel·lular es van utilitzar els limfòcits B procedents de melsa de ratolí 280.IgH.NOD i els seus germans no transgènics de 6 setmanes d'edat. També es va estudiar la proliferació cel·lular dels limfòcits B quan entraven en contacte amb la periferina i amb un estímul a través del BCR a les 12 setmanes d'edat. Per últim, també es va estudiar la proliferació cel·lular dels limfòcits B procedents de l'infiltrat d'illots, tant d'animals transgènics com no transgènics a les 12 setmanes d'edat.

#### **5.1. Proliferació de limfòcits B procedents de melsa**

##### ***5.1.1. Purificació dels limfòcits B de melsa***

Per realitzar la proliferació, primerament es va extreure i disgregar la melsa tal com es descriu en l'apartat 4.1.1. En aquest cas, el procediment es va dur a terme sota campana de flux laminar i amb les màximes condicions d'esterilitat possibles. En aquest cas, i a diferència de l'apartat de preparació de suspensió cel·lulars per citometria, la lisi d'eritròcits es va realitzar amb un tampó de lisi compost de 1,0297g de Trizima R hydrochloride (T3253, Sigma) i 3,735g de clorur d'amoni (141121, Panreac) en 500mL d'aigua destil·lada. Es va afegir 1mL del tampó de lisi al pellet cel·lular resultant de la disgregació de la melsa, i es va deixar actuar durant 8 minuts a temperatura ambient. Transcorregut aquest temps es va neutralitzar amb 15mL de tampó Facs (1% sèrum fetal boví en PBS 1X) i es va centrifugar durant 5 minuts a 900xg. Tot seguit, es va descartar el sobrenedant i es va incubar el pellet amb la mescla d'anticossos escollits per fer la purificació de limfòcits B per selecció negativa. La incubació dels anticossos es va realitzar en un volum de 100µl i durant 20 minuts a temperatura ambient. Els anticossos utilitzats es descriuen a la taula 14. D'aquesta manera, els limfòcits B que s'obtenien per

l'estudi restaven en el seu estat basal, ja que no havien estat alterats funcionalment per la interacció dels anticossos amb els seus marcadors de superfície. Transcorregut el temps d'incubació, es va realitzar un rentat afegint 1mL de PBS i es va centrifugar durant 5 minuts a 900xg. Finalment, es va ressuspensar el pellet amb 3mL de PBS per ser separades les cèl·lules amb el Facs ARIA II de BD de a unitat de citometria de l'Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol de Badalona.

Anticòs	Volum	Marcatge
Anti CD3- FITC (HM3401, Invitrogen)	6 µl	Limfòcits T
Anti Cd49b- PE (553858, BD)	4 µl	Limfòcits NK
Anti CD11c-APC ( 17-0114-82, Ebioscience)	4 µl	Cèl·lules dendrítiques
Anti CD11b- APC (553312, BD)	4 µl	Macròfags/monòcits
Anti CD138- APC (558626, BD)	4 µl	Cèl·lules plasmàtiques
Anti CD71- PE (553267, BD)	4 µl	Eritroblasts

**Taula 14.-** Mescla i volum dels anticossos utilitzats per a la selecció negativa dels limfòcits B. Alguns dels anticossos comparteixen el mateix fluorocrom, al ser una selecció negativa no té rellevància, ja que es seleccionaran les cèl·lules no marcades.

### 5.1.2. Estimulació dels limfòcits B

Els limfòcits B resultants de la selecció negativa van ser recollits en medi de cultiu complet (MMC) a 4°C, preparat tal i com es descriu en la taula 15.

Es va comprovar per citometria el resultat de la puresa obtinguda, en tots els casos superava el 90%.

Reactiu	Referència	Volum
Medi RPMI 1640 sense L-glutamina	(31870-025, Gibco)	43 mL
Sèrum fetal boví (FBS) d.c.	(10270-106, Gibco)	5 mL
L-glutamina 200mM	(G-8540, Sigma)	0,5 mL
Penicilina 10000U/mL	(644526, Laboratorios Normon S.A.)	0,5 mL
Estreptomicina 50mg/mL	7568-01, Laboratorios Reig Jofré)	0,5 mL
Piruvat sòdic 100mM	(11360-039, Gibco)	0,5 mL
2-mercaptoetanol 50 mM	(M6250, Sigma Aldrich Chimie)	0,05 mL

**Taula 15.-** Composició de 50 mL medi de cultiu complet utilitzats pels cultius cel·lulars.

Els limfòcits B obtinguts es van centrifugar durant 5 minuts a 900xg i es van ressuspendre amb MCC a una concentració de 2 milions de cèl·lules per mililitre. Es van sembrar per triplicat 200.000 cèl·lules per pou, en dues plaques de 96 pous (167008, Nunclon™ Surface, Nunc) i tot seguit s'hi van afegir els diferents estímuls a la concentració indicada a la taula 16.

Estímul	Concentració de treball	Referència
LPS	10µg/mL	(L-3012, Sigma)
Anti- C40 +	10µg/mL	(553787,BD)
Il-4	10ng/mL	( 404-MI-005,R&D systems)
Anti-BCR	5µg/mL	(715-006-020, AnffinitiPure F(ab') <sub>2</sub> , Jackson Immunoresearch)

**Taula 16.-** Estímuls utilitzats per la proliferació i les seves concentracions de treball.

Es van sembrar dues plaques per tal d'observar la proliferació en una i l'expressió de molècules coestimuladores i de MHC en l'altra. Transcorregudes les 48 hores després de l'addició de l'estímul, es van recuperar les cèl·lules d'una de les plaques i es van analitzar per citometria de flux, com es descriu en l'apartat 4.2.

### 5.1.3. Incorporació de Timidina tritiada, <sup>3</sup>[H]-TdR

L'estudi de proliferació es va realitzar a les 48 hores. Per poder-ho valorar, 16 hores abans de finalitzar el cultiu, es va afegir a cada pou 1 µCi/pou de <sup>3</sup>[H]-TdR (Net 027Z001MCThymidine, [methyl-3H], PerkinElmer). Transcorregut aquest temps es va procedir a la recollida dels limfòcits B utilitzant el Harvester (Harvester 96, Tomtec<sup>®</sup>), seguint les instruccions del fabricant. Acte seguit, es van recollir els disquets que contenien les cèl·lules i es van dipositar en tubs de comptatge on s'hi va afegir a cada un d'ells líquid de centelleig. Posteriorment, es van analitzar les comptes per minut (cpm) emeses pel líquid de centelleig utilitzant un comptador de partícules beta (I4150 Microbeta Wallac.Trilux).



## **5.2. Proliferació de limfòcits B cultivats amb periferina.**

A diferència dels estudis de proliferació de limfòcits B previs, en aquest cas s'utilitza el CFSE per observar la proliferació. Aquest marcador (CFSE) s'internalitza i queda al citoplasma de les cèl·lules i va perdent intensitat a mesura que les cèl·lules es divideixen. En cada divisió cel·lular la intensitat es divideix en dos, ja que es reparteix en les dues cèl·lules filles resultants. De manera, analitzant els pics que s'observen en el marcatge amb CFSE es poden calcular les diferents divisions cel·lulars. Per poder veure les divisions cel·lulars és necessari marcar les cèl·lules abans de l'estimulació.

### ***5.2.1 Preparació de la placa de cultiu cel·lular***

Com a causa de la naturalesa poc soluble de la periferina es va utilitzar la preiferina recombinant, generada en el nostre laboratori, i es va anclar a unes plaques de 96 pous MaxiSorp® (44-2404-21, Nunc). Per tal de fixar la proteïna a la placa es va preparar 10ug /ml de proteïna en una solució de pH9.5, composta de 50mM Tris-HCl i 150mM NaCl. Un cop reparada la solució amb la periferina es van dipositar 30µl a cada un dels pous de la placa, seguidament es va incubar durant 90 minuts a 37°C. Transcorregut aquest temps, es va mantenir a 4°C fins el moment en que s'hi van sembrar les cèl·lules. Previ a la sembra de les cèl·lules als pous, aquests últims es van rentar 3 vegades amb 200µl de PBS. Tot el procediment va ser realitzat sota campana de flux laminar per mantenir l'esterilitat de la placa en tot moment.

### ***5.2.2. Extracció i marcatge dels limfòcits***

En aquest cas es van cultivar els limfòcits B juntament amb els limfòcits T. Es van extreure i lisar les melses d'animals de 12 setmanes d'edat, com s'indica a l'apartat 4.1.2. però en aquesta ocasió sota la campana de flux laminar, per tal de treballar en condicions d'esterilitat. Després d'obtenir la suspensió cel·lular es va realitzar el comptatge cel·lular per poder procedir al marcatge limfocitari.

Un cop realitzat el comptatge cel·lular es va realitzar de nou un pellet cel·lular i es va ajustar amb PBS 1X estèril a una concentració cel·lular de  $5 \cdot 10^6$  cèl·lules/mL. A la suspensió cel·lular resultant se li va afegir el mateix volum d'una dil·lució 1:8000 de CFSE 5mM (C1157, Invitrogen), i es va deixar durant 10 minuts en condicions de foscor i a temperatura ambient. Seguidament es va fer un rentat de les cèl·lules amb tampó FACS, i es van centrifugar. Es va descartar el sobrenedant i es va ressuspendre el pellet cel·lular amb medi de cultiu complet, es va incubar en un

bany a 37°C durant 15 minuts. Transcorregut aquest temps es va centrifugar la suspensió cel·lular i es va tornar a ressuspensar el pellet amb medi de cultiu complet, però aquesta vegada ajustant les cèl·lules al volum de treball.

### **5.2.3. Estimulació dels limfòcits.**

En aquest cas, a diferència de la resta de proliferacions *in vitro*, l'estímul ja es trobava a la placa de cultiu, de manera que es van sembrar 500.000 cèl·lules per pou i es van deixar en cultiu durant 72 hores en incubadors cel·lulars (37°C i 5% CO<sub>2</sub>).

Transcorregut el temps de cultiu es van recollir les cèl·lules i es va analitzar el contingut de CFSE cel·lular mitjançant citometria de flux.

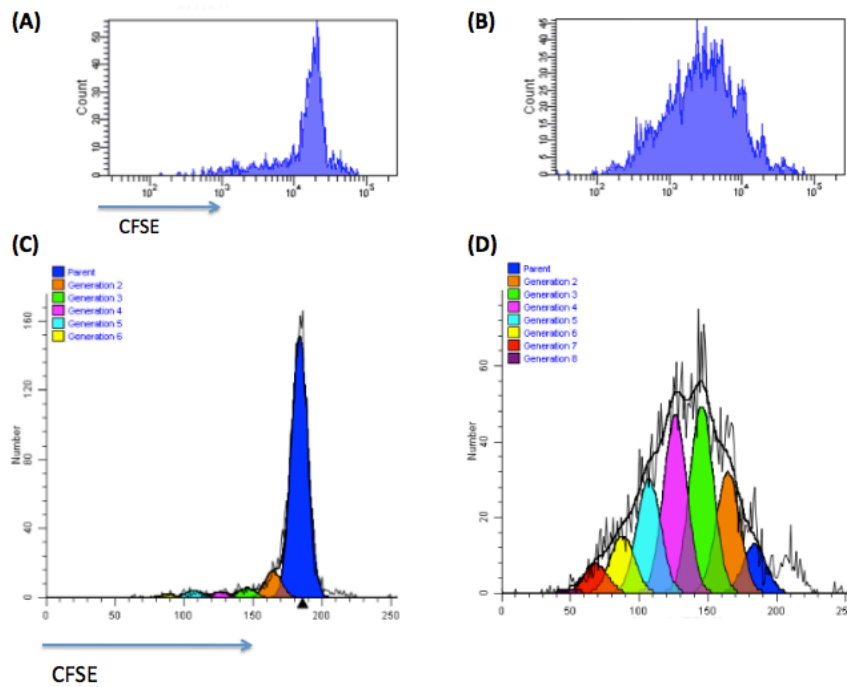
### **5.2.4. Càlcul de proliferació.**

Per últim, amb l'ajuda del programa ModFit LT (Verity software) es va calcular la proliferació dels limfòcits i es va obtenir l'índex de proliferació per a cadascuna de les condicions.

L'índex de proliferació és la suma de les cèl·lules en totes les generacions dividit pel nombre original de cèl·lules progenitores (*parent cells*). Aquest índex és molt útil per comparar les divisions cel·lulars entre cultius del mateix tipus cel·lular que han estat cultivats amb diferents estímuls, com és el cas d'aquest experiment.

Primerament, es van analitzar les condicions sense estímul, on no hi ha pràcticament proliferació, i es va marcar la població de cèl·lules en estat basal. En aquest cas l'índex de proliferació es situava entorn d'1, fet que indicava que havien proliferat molt poc. A continuació, es van analitzar les cèl·lules procedents de cultius amb estímul. Es va situar el pic de cèl·lules en estat G0 o G1 en el mateix punt que en la condició sense estimular, i es va calcular l'índex de proliferació de forma automàtica.

A la figura 13 s'observa el canvi en el marcatge de CFSE en cèl·lules que no han proliferat (condició sense estímul) i les que sí que ho han fet. A sota s'observa com s'ajusten els diferents pics de CFSE amb les diferents divisions cel·lulars.



**Figura 13.-** Histograma obtingut del marcatge amb CFSE de cèl·lules que no han proliferat (A) i cèl·lules que han proliferat (B). Ajust de les diferents divisions cel·lular als pics d'intensitat del CFSE mitjançant el programa ModFit (C, D).

Aquest sistema de càlcul de proliferació cel·lular va ser emprat, també, en les proliferacions cel·lulars de limfòcits procedents d'illot pancreàtic, que es comenta en el següent apartat (apartat 5.3).

Per tal de poder analitzar la proliferació dels limfòcits B procedents de melsa, vàrem establir un índex de proliferació en funció de les cèl·lules, en comptes de la intensitat de fluorescència del marcatge amb CFSE. Aquest càlcul es descriu a continuació i compara el nombre de limfòcits B en condicions amb estímul respecte la condició sense estimular.

$$\text{Índex de proliferació} = \frac{\text{Núm. Limfòcits B (condició amb estímul)}}{\text{Número de limfòcits}} \div \frac{\text{Núm. Limfòcits B (S.E.)}}{\text{Número de limfòcits}}$$

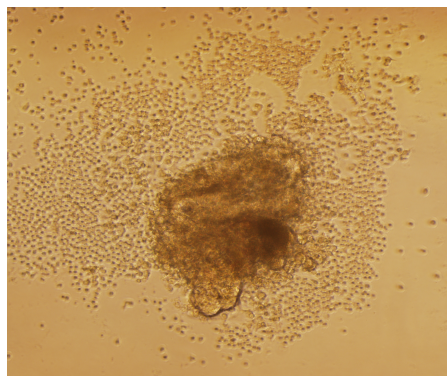
Tot i que es tracta d'un sistema molt útil per al càlcul de proliferació cel·lular, en alguns casos es va observar que els pous control, on es trobaven els limfòcits B sense estímul, la gran majoria de limfòcits moria a les 72 hores i només sobreviuen els que havien estat capaços de proliferar. Com a conseqüència d'aquesta mort massiva, es va donar la paradoxa que els índex de proliferació dels pous control era, en alguns casos, superior a la dels pous on hi havia estímul, però en canvi, la cel·lularitat era major en els pous amb estímul.

### **5.3. Proliferació cel·lular de limfòcits procedents dels illots pancreàtics**

Igual que en els estudis de proliferació dels limfòcits B de melsa estimulats amb periferia, en aquest cas també es va utilitzar el marcatge amb CFSE per analitzar la proliferació dels limfòcits B infiltrants a illots pancreàtics.

#### ***5.3.1. Extracció i marcatge dels limfòcits***

Per realitzar l'assaig de proliferació dels limfòcits procedents dels illots pancreàtics, primerament es van extreure els illots mitjançant una digestió amb col·lagenasa, es descriu a l'apartat 4.1.1, però en aquest cas, en condicions de màxima esterilitat possible. Els tampons i reactius utilitzats van ser filtrats amb filtres de 0,45µm i 0,22µm, i la disgregació i captura d'illots es va dur a terme sota la campana de flux laminar. En aquest cas, i a diferència de l'apartat 4.1.2, no es van disgregar els illots, sinò que aquests es van cultivar els illots amb medi RPMI (31870-025, Gibco) durant 16h en incubadors cel·lulars (37°C i 5% CO<sub>2</sub>) (Figura 14). Durant aquest període de temps, els limfòcits infiltrants abandonen l'illot i s'ecampen pel pou on es troba l'illot. D'aquesta manera es van poder obtenir els limfòcits sense la necessitat de la disgregació mecànica, ja que aquesta provoca trencament cel·lular que podria interferir en els estudis de proliferació cel·lular.



**Figura 14.-** Fotografia dels limfòcits sortint de l'illot pancreàtic després de 16 hores de cultiu Imatge presa a 10 augments.

Transcorregudes les 16 hores es van recuperar els illots i els limfòcits, es van dipositar en tubs de falcon i es va esperar 5 minuts per a què els illots sedimentessin. Seguidament, es va recuperar el sobrenedant que contenia els limfòcits i es va fer un pellet cel·lular (centrifugació 5 minuts a 900xg). Es va ressuspènere el pellet cel·lular en 1mL de PBS 1X estèril i es va fer el comptatge cel·lular mitjançant una cambra de Neubauer i blau Tripà (T8154, Sigma) que permetia observar la viabilitat de les cèl·lules.

Un cop realitzat el comptatge cel·lular es va realitzar de nou un pellet cel·lular i es va ajustar amb PBS 1X estèril a una concentració cel·lular de  $5 \cdot 10^6$  cèl·lules/mL. A la suspensió cel·lular resultant se li va afegir el mateix volum d'una dil·lució 1:8000 de CFSE 5mM (C1157, Invitrogen). Es va mesclar i es va deixar durant 10 minuts en condicions de foscor i a temperatura ambient. Tot seguit, es va fer un rentat de les cèl·lules amb FACS buffer en excés, i es va centrifugar. Es va descartar el sobrenedant i es va ressuspènere el pellet cel·lular amb medi de cultiu complet, es va incubar en un bany a 37°C durant 15 minuts. Transcorregut aquest temps es va centrifugar la suspensió cel·lular i es va tornar a ressuspènere el pellet amb medi de cultiu complet, però aquesta vegada ajustant el volum de treball.

En aquest cultiu s'ha de tenir en compte que al no realitzar cap selecció hi ha limfòcits B i T. Tot i això, al final de l'estudi només s'analita la proliferació dels limfòcits B.

### **5.3.2. Estimulació dels limfòcits**

Després d'ajustar el volum de treball, es van sembrar 120.000 cèl·lules per pou en una placa de 96 pous i es va afegir els diferents estímuls, igual que en el cas de la proliferació de limfòcits B (apartat 5.1.2). Es van deixar les cèl·lules en cultiu durant 72 hores. Transcorregut aquest temps es van recollir les cèl·lules i es va analitzar el contingut de CFSE cel·lular, mitjançant citometria de flux.

La proliferació cel·lular es va calcular com s'explica a l'apartat 5.2.4.

## **6.- Estudis *in vivo***

Es van realitzar estudis *in vivo* amb el pèptid DD04107 en animals de la soca NOD i NOD.RAG2-/- . L'objectiu d'aquest estudi era bloquejar la formació de vacúols observada en els ganglis espinals, i observar si es produïen canvis en l'evolució de la malaltia. Per dur a terme aquests estudis es va injectar el compost periòdicament durant 6 o 9 setmanes, en funció de la soca, per via subcutànea.

El pèptid DD04107 va ser cedit pel Dr. Antonio Ferrer-Montiel de la Universitat Miguel Hernandez d'Elx. El pèptid es va dissoldre en PBS 1X a una concentració de 0'1mg/ml.

### **6.1. Tractament amb el pèptid DD04107 en la soca NOD.RAG2-/-**

En els animals de la soca NOD.RAG2-/-, Es va administrar el pèptid a 5 femelles de 3 setmanes per via subcutanea a una concentració de 1mg /kg (com s'havia adiministrat en altres estudis<sup>214</sup>) durant 3 cops per setmana, a dos intervals de 48 hores i un de 72 hores. Es van utilitzar 5 femelles NOD.RAG2-/- com a control, a les que només s'injectava PBS. La injecció del compost es va dur a terme durant 6 setmanes.

Un cop finalitzat l'estudi es van recollir els ganglis espinals en els ratolins NOD.RAG2-/- i es van processar com es descriu en l'apartat 2.7.

### **6.2. Tractament amb el pèptid DD04103 en la soca NOD**

Respecte del tractament dels animals NOD, aquest tenia com a objectiu frenar la infiltració leucocitària als illots pancreàtics Es per això que el tractament es va començar a les 3 setmanes, on la infiltració leucocitària és pràcticament inexistent en ratolins NOD, fins a les 12 setmanes, on la infiltració leucocitària és clarament visible.

Es va administrar a 5 femelles NOD de 3 setmanes per via subcutània a una concentració de 1 mg/kg 3 cops per setmana , amb dos intervals de 48 hores i un de 72 hores. Es van utilitzar 5 femelles NOD a les que se'ls injectava només PBS com a control. El tractament es va prolongar 9 setmanes, fins a les 12 setmanes d'edat dels ratolins.

Un cop finalitzat l'estudi es van recollir els pàncrees dels ratolins NOD. Aquests òrgans es van processar i tenyir per tincions d'hematoxilina-eosina com s'indica a l'apartat 2 de materials i mètodes.

## **7.- Càlculs estadístics**

Els càlculs estadístics van ser realitzats utilitzant el programa Prism 5.0a (GraphPad software Inc., San Diego, California, USA).

Per a la comparació de diferents grups, primerament es va aplicar el test de normalitat Agostino & Pearson omnibus normality test, que determina si les dades

segueixen una distribució normal. A continuació, i en funció de les característiques de les dades, es va aplicar Unpaired T-test o el Man-Whitney test.

Per a la comparació de la incidència de diabetis entre les diferents soques es va utilitzar el test Long-rank (Kaplan-Cox).

## VI- RESULTATS





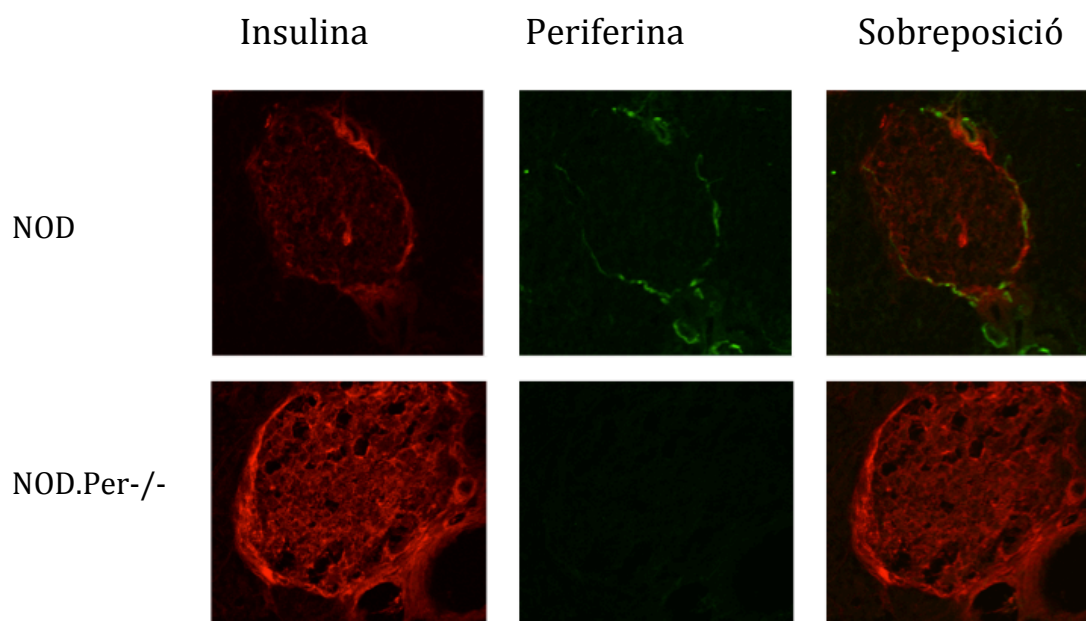
## 1.- Expressió de la periferina en els ratolins knockout

Estudis previs portats a terme en el nostre laboratori suggerien que la periferina podia tenir un paper rellevant com a autoantigen diana en el decurs de la T1D. Per poder estudiar aquest efecte, es va generar un ratolí NOD Knockout pel gen de la periferina (NOD.Per<sup>-/-</sup>). La generació d'aquest model es va portar a terme mitjançant retrocreuament, tal i com es descriu a l'apartat de material i mètodes.

Els primers descendents de la soca NOD.Per<sup>-/-</sup> van ser utilitzats per a la comprovació de la correcta supressió de l'expressió del gen de la periferina. Aquesta comprovació es va fer mitjançant immunofluorescència sobre teixit pancreàtic.

A continuació s'observa els resultats de la immunofluorescència (Figura 15). En vermell es va marcar la insulina, per tal de detectar els illots pancreàtics, i en verd es va marcar la periferina, present a les neurones que innerven els illots.

En aquests resultats es confirma que els animals de la soca NOD.Per<sup>-/-</sup> no expressen periferina, a diferència dels animals de la soca NOD. A la tinció sobre els illots pancreàtics del ratolí NOD es pot apreciar la periferina present a les neurones sensorials que es troben resseguint el contorn de l'illot.



**Figura 15.-** Tinció sobre pàncrees de ratolins de la soca NOD.Per<sup>-/-</sup> i NOD de 9 setmanes d'edat, a on s'observa la diferència d'expressió de la periferina en una soca i l'altra. A la primera columna s'observen els illots pancreàtics marcats amb un anticòs anti-insulina (vermell). En les imatges centrals s'observa la periferina marcada amb un anticòs anti-periferina (verd). En les imatges de la columna dreta s'observa la sobreposició de les dues columnes anteriors. Les imatges van ser preses a 40 augments.

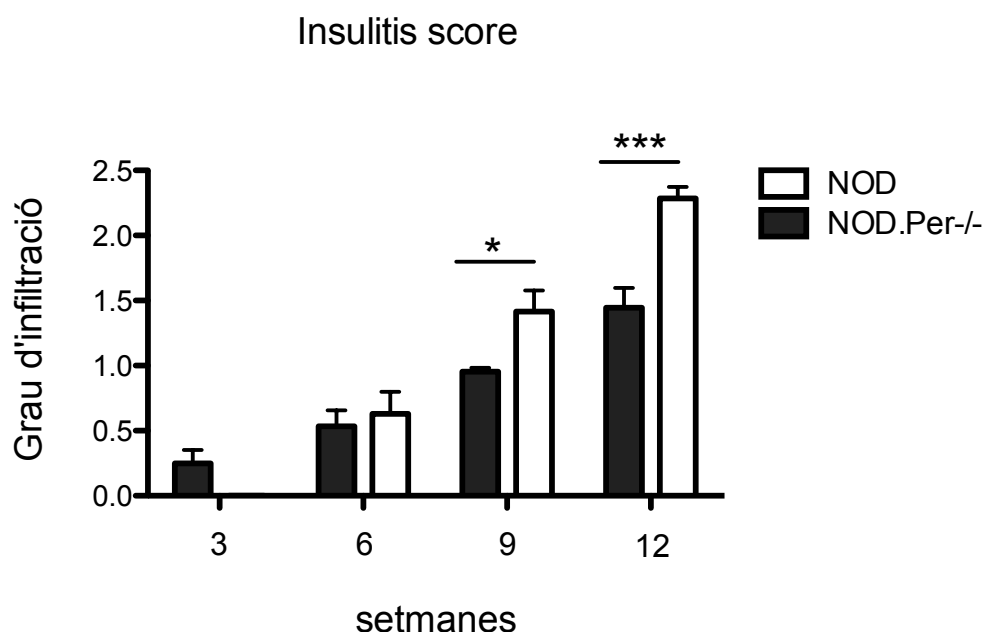
## 2.- Desenvolupament de la malaltia en la soca NOD.Per-/-

### 2.1. Evolució de la infiltració

La soca NOD.Per-/- es va utilitzar per analitzar el paper de la periferrina com antigen clau en el desenvolupament de la diabetis en els ratolins NOD. Es va estudiar l'evolució de l'infiltrat leucocitari als illots pancreàtics a diferents edats, per tal de conèixer el grau d'infiltració a l'illot durant el període de desenvolupament silent de la malaltia.

Els resultats van mostrar que la soca NOD.Per-/- mostrava un grau d'infiltració menor a les 9 i a les 12 setmanes d'edat en comparació la soca NOD (Figura 16). Aquesta diferència és estadísticament significativa (9 setmanes  $p\text{-value}<0.05$ , 12 setmanes  $p\text{-value}<0.0001$ ).

Dels resultats de *l'insulitis score* se n'extreu que la diabetis evoluciona més lentament en la soca NOD.Per-/- en comparació a la soca NOD, concretament en les etapes prèvies al debut de la malaltia. Aquests resultats suggereixen un paper rellevant de la periferrina durant el desenvolupament de la malaltia com a autoantigen reconegut durant l'atac als illots en les primeres etapes del procés.



**Figura 16.-** Grau d'infiltració (*insulitis score*) de ratolins de les soques NOD i NOD.Per-/. Els resultats fan referència a 3 ratolins femelles per grup. Les diferències més importants s'observa a les 9 i 12 setmanes d'edat, amb significança estadística en els dos casos (9 setmanes  $p\text{-value}<0.05$ , 12 setmanes  $p\text{-value}<0.0001$ ).

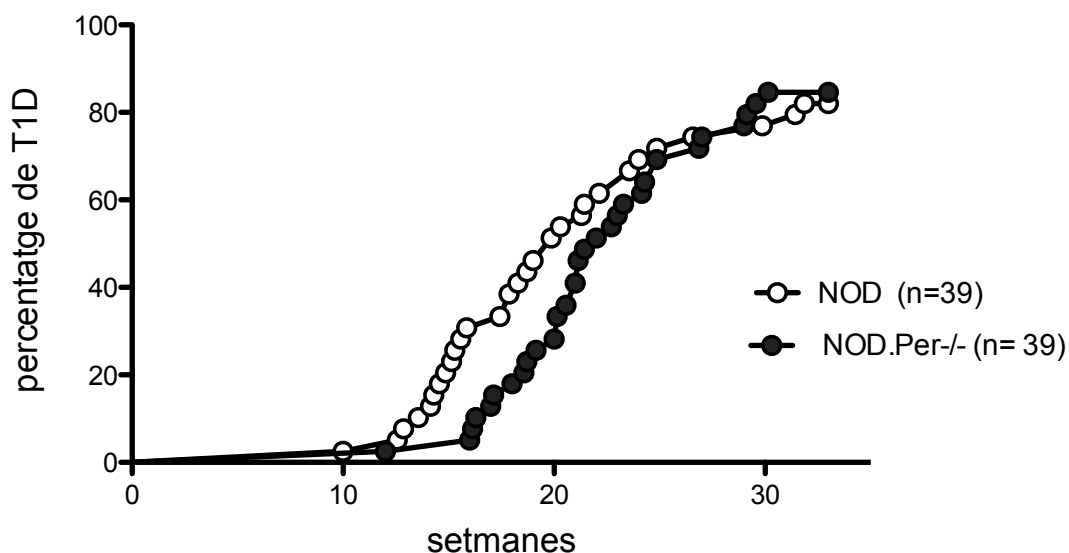
## 2.2. Incidència de la diabetis en la soca NOD.Per-/-

Per continuar aprofundint en l'estudi del paper de la periferina en la T1D, es va estudiar la incidència de diabetis acumulada en aquest model fins a les 35 setmanes de vida.

La incidència final de la malaltia va resultar ser molt similar a la incidència obtinguda en la soca NOD, al voltant del 84%. Tot i que la incidència final era semblant a la NOD, el debut de la malaltia en aquesta soca tenia una aparició més tardana, però entorn de les 20 setmanes s'accelerava fins a obtenir uns valors d'incidència al final del seguiment semblants als dels NOD (Figura 17). Aquesta aparició més tardana concorda amb els resultats obtinguts en l'estudi de la infiltració leucocitària, on s'observa una infiltració més lenta en la soca NOD.Per-/-.

La delació de periferina causa una aparició més tardana de la malaltia, en canvi, no sembla tenir efecte en la incidència final de la diabetis. Per tant, d'aquests resultats se n'extreu que la periferina no és necessària en el desenvolupament de la diabetis. No obstant això, sembla tenir un paper rellevant com a autoantigen diana en el procés autoimmunitari, especialment en les fases inicials del procés, ja que la seva absència endarrereix l'inici de la infiltració i també el debut de la malaltia.

### Incidència en femelles



**Figura 17.-** Incidència de la T1D en femelles de la soca NOD.Per-/- . Es mostren els percentatges d'incidència de la malaltia en cada una de les soques.

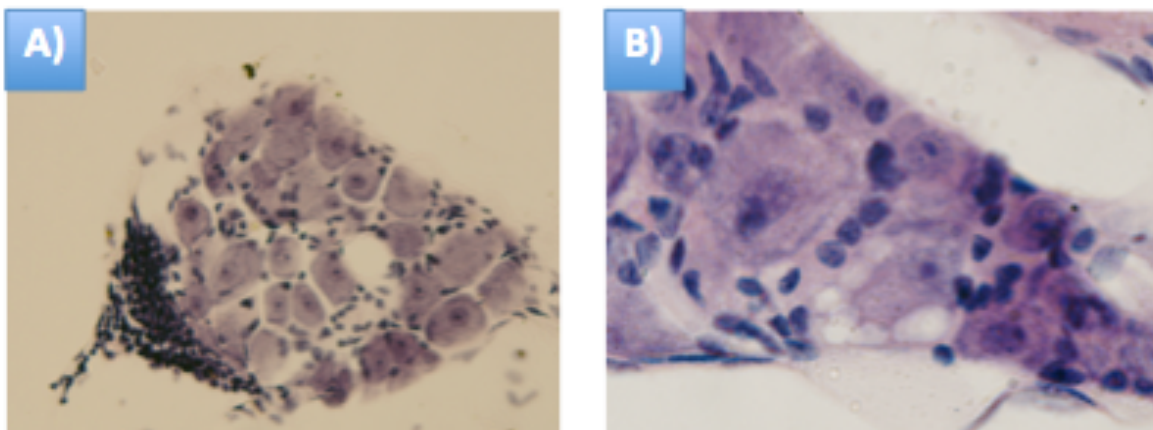
### 3.- Estudi dels ganglis espinals

#### **3.1. Estudi de la soca NOD**

Alguns estudis realitzats en ratolins NOD suggereixen que defectes en les neurones sensibles disminueixen la secreció de neurotransmissors als illots, fet que afavoreix l'estrès de les cèl·lules beta pancreàtiques i la infiltració limfocitària <sup>119</sup>.

En els ganglis raquidis és on es troben els cossos cel·lulars de les neurones sensibles que innerven el pàncrees. Amb l'objectiu de veure si hi havia anomalies en aquestes neurones, es va realitzar un estudi histològic.

El resultat de l'estudi histològic va mostrar dues afectacions diferents. La primera afectació que es va observar va ser que algunes de les neurones dels ganglis de les arrels dorsals presentaven vacúols de grans dimensions al seu citoplasma. L'altra afectació observada va ser que algun dels ganglis espinals també presentaven infiltració leucocitària, igual a la que s'observa als illots pancreàtics (Figura 18).

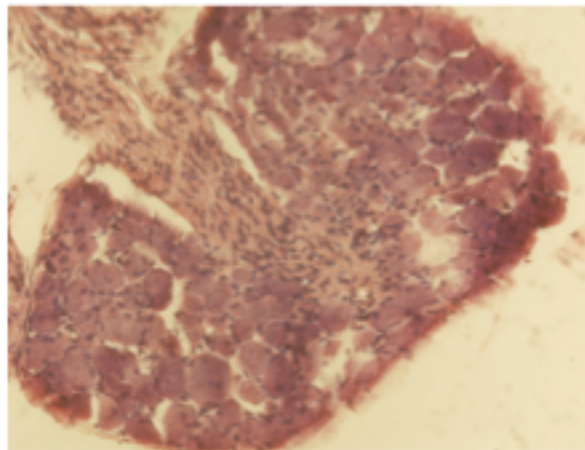


**Figura 18.-** A) Imatge de la infiltració leucocitària en els ganglis raquidis. Imatge presa a 20 augments B) imatge dels vacúols observats al citoplasma cel·lular de les neurones sensorials. Imatge presa a 60 augments. Estudis realitzats en femelles de 32 setmanes.

### **3.2. Estudi de la soca C57BL/6**

Després d'observar aquestes afectacions en les neurones sensorials es va voler comprovar que fos quelcom intrínsec de la soca NOD. És per això que també es van analitzar els ganglis raquidis d'animals de la soca C57B/6.

Els resultats de l'anàlisi van mostrar que en la soca C57B/6 no hi havia presència dels vacúols observats en la soca NOD al citoplasma, ni la infiltració leucocitària (Figura 19).

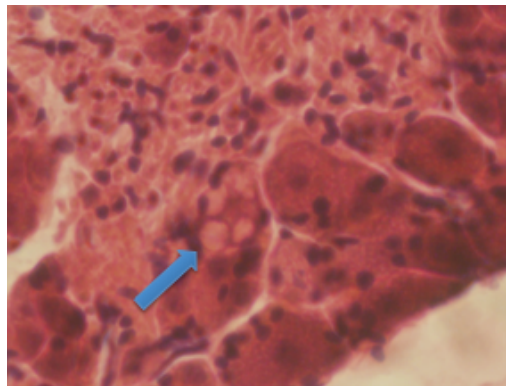


**Figura 19.-** Imatge representativa de l'estat dels ganglis raquidis en femelles de la soca C57B/6 a les 32 setmanes. Imatge presa a 20 augments.

### **3.3. Estudi de la soca NOD.Per-/-**

Com s'ha esmentat anteriorment, en estudis previs realitzats pel nostre grup es va observar que la periferina era un dels principals antígens reconeguts pels limfòcits B a l'infiltrat leucocitari als illots. Per tant, les lesions observades podrien ser degudes a la resposta autoimmunitària contra aquest autoantigen. Per veure si era així, es va analitzar la presència d'aquestes afectacions observades en les neurones sensorials dels ganglis en la soca NOD.Per-/-.

Els resultats obtinguts van mostrar que els vacúols observats en els citoplasmes cel·lulars no era degut a l'alteració de l'expressió de la periferina o a conseqüència de la resposta autoimmunitària contra aquesta. A la figura 20 s'observa com en les cèl·lules sensorials dels animals de la soca NOD.Per-/- també presenten aquesta afectació. En canvi, no es va observar infiltració leucocitària en cap de les femelles estudiades.

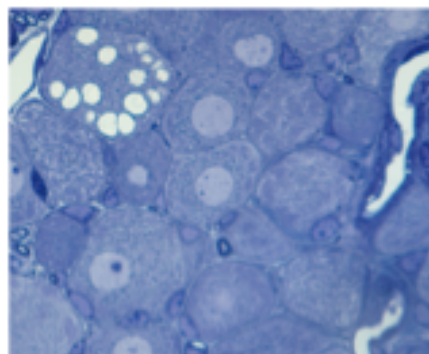


**Figura 20.-** Imatge representativa de l'estat de les neurones dels ganglis raquidis en femelles de la soca NOD.Per-/- a les 32 setmanes. La fletxa assenyala els vacúols presents en una cèl·lula sensorial. Imatge presa 40 augments.

### 3.4. Estudi de la soca NOD.RAG2-/-

Després d'observar que l'aparició de macrovacúols als citoplasmes cel·lulars no estava relacionada amb l'expressió de la periferina, es va decidir analitzar si aquesta afectació era com a conseqüència d'un atac autoimmunitari. És per això que es va estudiar els ganglis raquidis d'animals de la soca NOD.RAG2-/-, una soca immunodeficient que no té ni limfòcits T ni limfòcits B. En aquesta ocasió es van realitzar talls semifins per tal d'analitzar millor la presència de l'afectació citoplasmàtica.

Els resultats observats van mostrar que els animals de la soca NOD.RAG2-/- també presentaven vacúols al citoplasma cel·lular d'algunes cèl·lules sensorials. Per tant, l'afectació observada no era conseqüència de l'atac immunitari, sinó quelcom propi de la soca NOD (Figura 21).

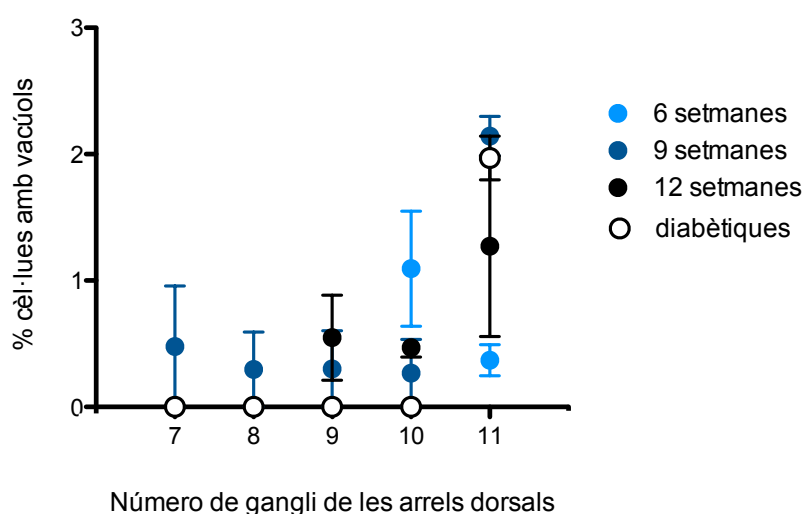


**Figura 21.** -Imatge representativa de l'estat de les neurones dels ganglis espinals en femelles de la soca NOD.RAG2-/- a les 32 setmanes. Imatge presa a 40 augments.

Després d'observar que el fenomen apareixia també en animals de la soca NOD.RAG2-/-, es va decidir estudiar més a fons aquest fenomen. Concretament, es va analitzar si la formació dels vacúols o la infiltració leucocitària observada correlacionava amb l'aparició de la diabetis, o si l'afectació incrementava amb la presència de la malaltia. És per això que es va decidir realitzar un estudi a edats prèvies al debut de la malaltia (6, 9 i 12 setmanes) i animals diabètics. És van analitzar els ganglis raquidis que s'han relacionat amb la innervació del pàncrees. Els ganglis analitzats van ser els ganglis toràcics del 7 a l'11.

Els resultats obtinguts va mostrar que a totes les edats es trobava la presència de d'algunes cèl·lules sensorials amb l'afectació citoplasmàtica. Però no es va poder apreciar cap correlació entre l'edat i l'afectació (Figura 22). Tampoc hi havia diferències significatives respecte a l'afectació en animals diabètics i animals que no havien debutat en la malaltia. En els ganglis amb major afectació, els vacúols es trobaven presents al voltant d'un 3% de les cèl·lules dels ganglis espinals.

### Afectació de les neurones



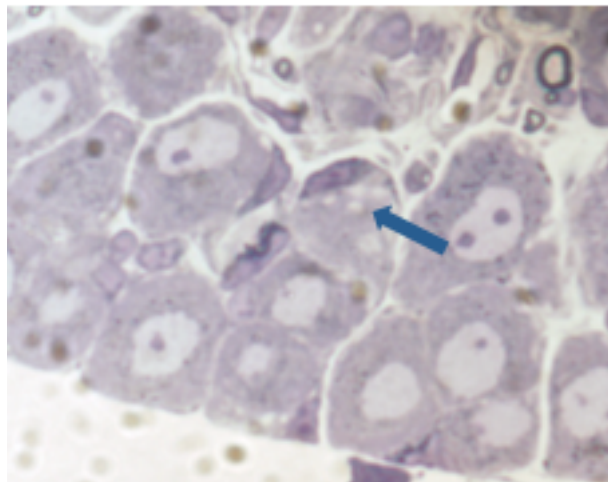
**Figura 22.** -Gràfica del resultat de l'afectació dels vacúols en els cossos neuronals presents en els ganglis espinals en femelles de la soca NOD.RAG2-/- i en femelles diabètiques de la soca NOD. Estudi realitzat en 3 animals per a cada una de les edats.



### 3.5. Estudi de la soca NOD.RAG2<sup>-/-</sup> a les 2 setmanes

Després d'analitzar els ganglis a diferents edats, es va voler analitzar la presència de vacúols a edats més joves. És per això que es van analitzar els ganglis raquidis d'animals de 2 setmanes d'edat.

Els resultats observats van mostrar que en algunes de les cèl·lules dels ganglis espinals hi havia vacúols però d'una mida més petita. Aquests resultats apuntarien que aquest fenomen és present ja en edats joves, tot i que d'una manera no tan notòria, com l'observada en edats més adultes (Figura 23).

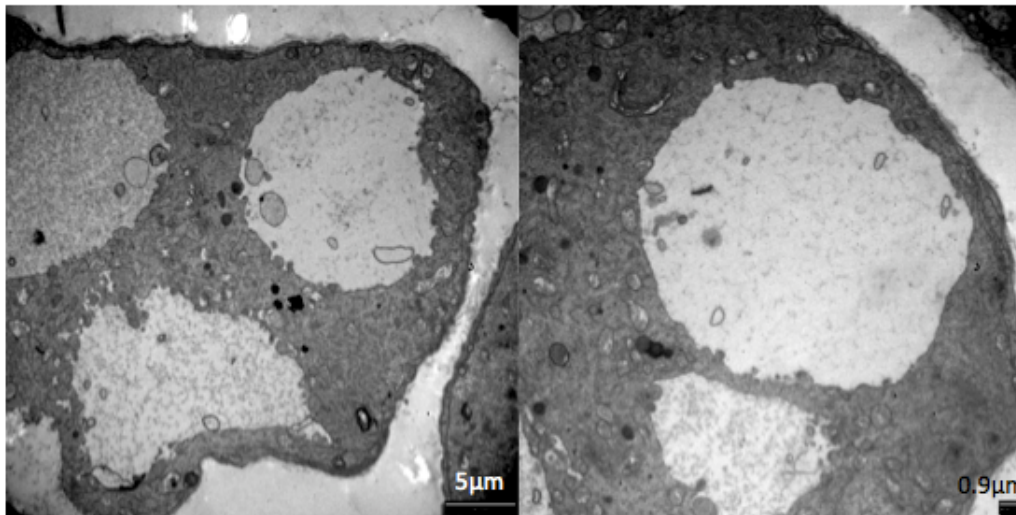


**Figura 23.-** Imatge representativa de l'estat de les neurones dels ganglis espinals en femelles de la soca NOD.RAG2<sup>-/-</sup> a les 2 setmanes. La fletxa assenya els vacúols presents en una cèl·lula sensorial. Imatge presa 40 augments.

### 3.6. Estudi per microscòpia electrònica

Per aprofundir més en l'estudi dels vacúols de gran mida presents en el citoplasma cel·lular, es van analitzar les cèl·lules afectades mitjançant microscòpia electrònica. Utilitzant la microscòpia electrònica es va analitzar si els vacúols presentaven doble membrana, tret característic dels vacúols formats com a conseqüència d'un procés autofàgic.

Els resultats van mostrar que els vacúols estaven compostos per una sola membrana i que la seva mida anava de poques micres, els més petits, a entorn de 20 micres els vacúols més grans, com s'observa a la figura 24. Per tant, el fenomen que s'observava en el citoplasma d'algunes cèl·lules sensorials no és conseqüència d'un procés autofàgic.



**Figura 24.-** Imatges representatives dels vacúols analitzats mitjançant microscòpia electrònica realitzades en femelles de la soca NOD.RAG2-/- a les 15 setmanes.

### 3.7. Estudi de la infiltració leucocitària

Per estudiar més a fons el fenomen de la infiltració leucocitària que s'havia observat en algun dels ganglis analitzats, es va decidir estudiar la presència de limfòcits i cèl·lules dendrítiques mitjançant estudis histològics per immunofluorescència utilitzant anticossos específics, marcats amb diversos fluorocroms. Els estudis es van portar a terme en ratolins femelles NOD de 15 setmanes d'edat.

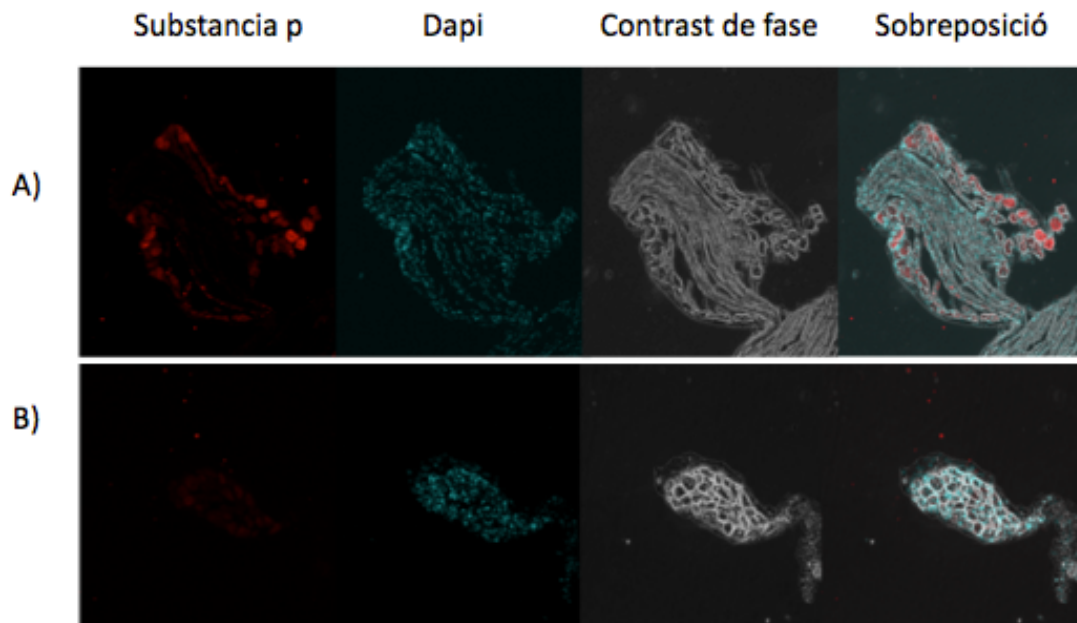
Els resultats no van permetre observar la presència de limfòcits T o B, ni cèl·lules dendrítiques infiltrants als ganglis raquidis dels animals analitzats.

### 3.8. Estudi de la substància p

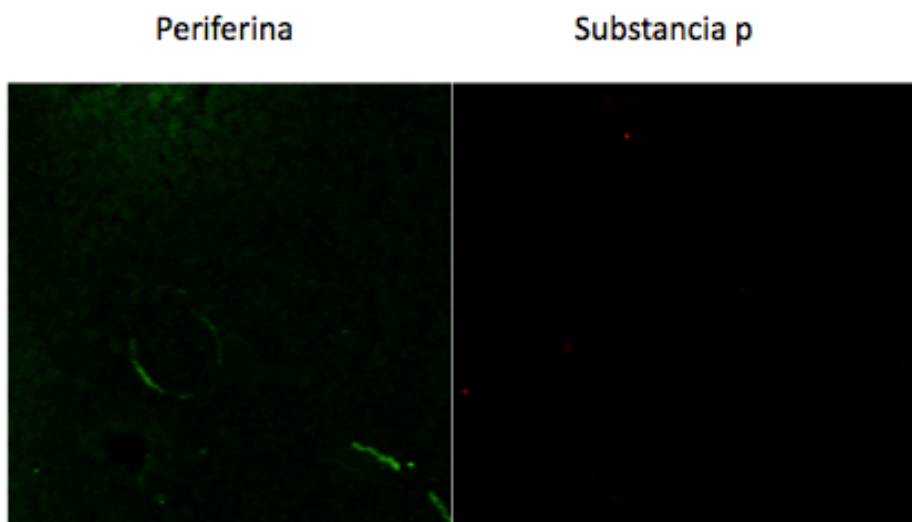
Estudis realitzats pel grup Dr Dosch (Razavi *et al.* 2006) subratllen el paper del neurotransmissor substància p (Sp), alliberat per les neurones sensorials, en el decurs de la diabetis. Quan s'administra Sp de manera exògena, l'infiltrat leucocitàri present als illots pancreàtics reverteix en gran mesura, i es recuperen els valors de normaglicèmia<sup>123</sup>. És per això que es va decidir analitzar mitjançant immunofluorescència la presència d'aquest neurotransmissor, en els cossos neuronals i en les neurones que es troben envoltant els illots.

Els resultats obtinguts van mostrar que algunes de les neurones presents als ganglis espinals presentaven substància p, com s'observa a la figura 25. En canvi, no va ser possible observar la presència d'aquest neurotransmissor a les neurones que innerven el pàncrees (Figura 26). No obstant això, no es pot concloure que el

neurotransmissor no és present en aquestes neurones, ja que la manca de detecció podria ser deguda a la manca de sensibilitat de la tècnica emprada.



**Figura 25.-** Immunofluorescències realitzades en els ganglis espinals.. En la imatge A) s'observa la tinció de Sp (vermell), Dapi (blau), el contrast de fase i la sobreposició. En la imatge B) s'observa el control negatiu. Imatges preses a 10 augments. Estudi realitzat en femelles NOD.RAG2<sup>-/-</sup> de 15 setmanes.



**Figura 26.-** Immunofluorescència realitzada en el pàncrees de femelles NOD.RAG2<sup>-/-</sup> de 15 setmanes. En la primera imatge s'observa el marcatge de la periferina innervant i envoltant un illot. A la segona imatge es mostra el marcatge amb Sp realitzat en el mateix tall. Imatge presa a 20 augments.

## 4.-Tractament amb el pèptid DD04107

En estudis realitzats *in vivo* pel grup del Dr. Antonio Ferran-Montiel van descriure l'efecte del pèptid DD04107 sobre les neurones TRPV1+, i l'efecte en diferents models animals<sup>214</sup>. El mecanisme d'acció del pèptid és mitjançant la inhibició de la fusió vesicular, que a la vegada inhibeix l'exocitosi neuronal i prevé l'alliberament de CGRP, quan la neurona és estimulada a través del receptor TRPV1+.

El pèptid DD04107 és soluble en aigua, fet que facilita l'administració als animals. Aquest pèptid ja havia estat testat en diferents models animals i havia mostrat un bon bloqueig de l'acció del receptor, a més de ser ben tolerat pels animals.

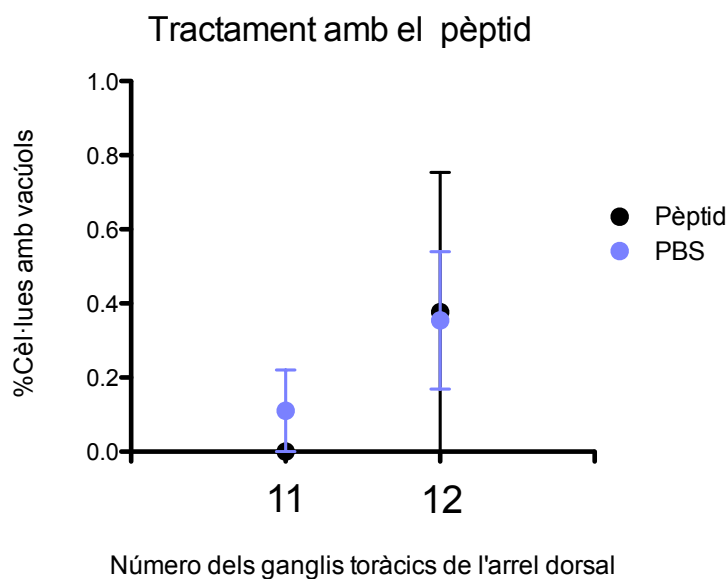
En altres estudis realitzats pel grup Dr. Dosch, es va descriure que la supressió de l'acció de les neurones TRPV1+ en animals de la soca NOD, reduïa de manera significativa la infiltració leucocitària i l'aparició de la malaltia<sup>123</sup>.

Per tal de veure si l'acció del pèptid bloquejava l'acció de les neurones TRPV1+ i revertia la infiltració leucocitària i els vacúols citoplasmàtics, es va realitzar un tractament amb aquest pèptid en animals de la soca NOD i NOD.RAG2-/-.

### **4.1. Tractament als animals de la soca NOD.RAG2-/-**

Per observar l'efecte del pèptid sobre les neurones sensorials, concretament en les neurones que presentaven els vacúols al seu citoplasma, es va administrar el pèptid a una concentració de 1mg/kg a animals de 3 setmanes d'edat per via subcutània. Es va administrar el pèptid 3 cops per setmana, en dos intervals de 48 hores i un de 72, durant 6 setmanes. Després de realitzar el tractament es van aïllar els ganglis raquidis i es va analitzar l'afectació als ganglis toràcics número 11 i 12.

Els resultats van mostrar que en els ganglis analitzats, tant els procedents dels animals control com els dels animals tractats amb el pèptid, hi havia cèl·lules que presentaven vacúols al seu citoplasma. A continuació hi ha la representació gràfica de l'afectació citoplasmàtica (Figura 27).

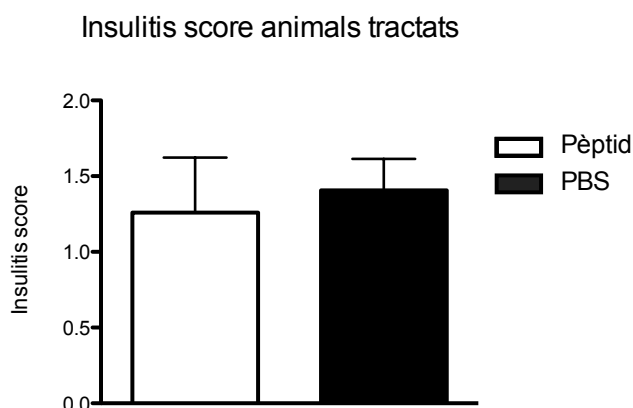


**Figura 27.-** Gràfica del resultat de l'afectació dels vacúols en els cossos neuronals presents en els ganglis espinals en animals de la soca NOD.RAG2-/- després del tractament amb el peptid. Estudi realitzat en 5 animals de 9 setmanes d'edat per a cada un dels grups.

## 4.2. Tractament als animals de la soca NOD

Per tal d'observar si el tractament amb el peptid tenia algun efecte en l'atac autoimmunitari, es va realitzar un estudi d'*insulitis score* en els animals tractats amb el peptid. Es va tractar un grup de 5 animals amb el peptid i un altre amb PBS. El tractament es va començar a les 3 setmanes d'edat i es va prolongar fins a les 12. El peptid es va administrar periòdicament (Igual que en la soca NOD.RAG2-/-) per via subcutània. Transcorregudes 9 setmanes de tractament, es va analitzar l'infiltrat leucocitari present als illots pancreàtics.

Els resultats van mostrar que no hi havia diferències significatives entre els animals tractats amb el peptid respecte als animals del grup control, com s'observa a la gràfica a continuació (Figura 28).



**Figura 28.-** Gràfica del resultat de l'insulitis score realitzat en femelles de la soca NOD després del tractament amb el pèptid. Estudis realitzats en 5 femelles de 12 setmanes d'edat per a cada un dels grups.

## 5.- Anàlisi d'expressió dels transgens

Com ja s'ha comentat anteriorment, estudis previs del grup varen mostrar que l'especificitat antigènica d'una proporció predominant de limfòcits B infiltrants els illots pancreàtics era la periferina. Aquests estudis, juntament amb els que acabem de comentar del ratolí NOD.Per-/-, ens van conduir a pensar en la rellevància de la resposta contra aquest autoantigen durant el procés de desenvolupament T1D en NOD, i a generar un ratolí transgènic de limfòcits B amb especificitat anti-periferina.

Amb aquest objectiu es va seleccionar un dels hibridomes generat en el nostre grup d'una femella NOD diabètica amb especificitat per a la periferina. D'aquest hibridoma, H280, es van clonar les cadenes lleugera i pesada per generar el constructe del transgen.

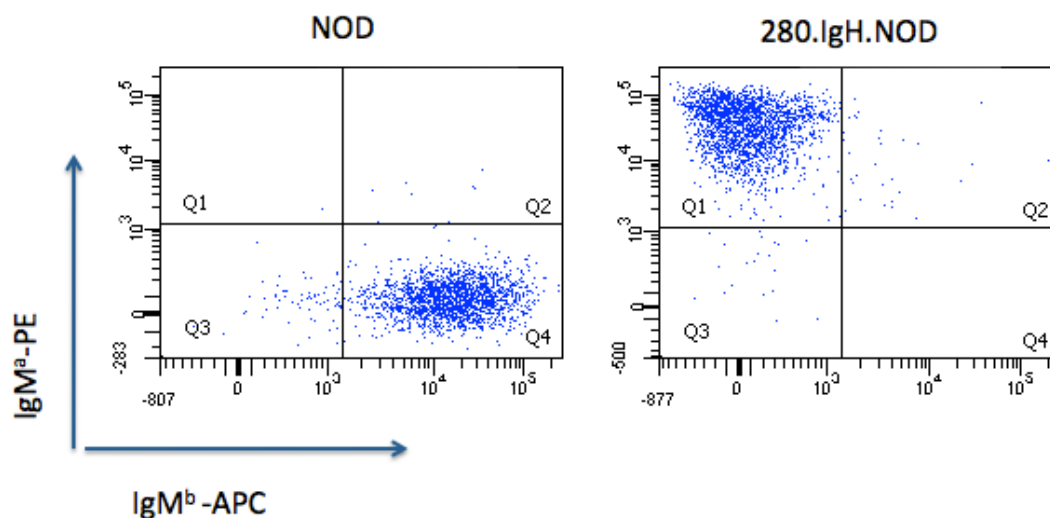
A continuació es mostren els resultats del ratolí que expressa només la cadena pesada de la immunoglobulina: 280.IgH.NOD.

### **5.1. Expressió de IgM**

Els primers descendents de la soca 280.IgH.NOD van ser utilitzats per analitzar la correcta l'expressió del transgen, mitjançant citometria de flux. La regió constant del gen de les immunoglobulines IgM i IgD del transgen procedeix del fons genètic del ratolí balb/c, i per aquesta raó són de l'haplotip "a", en canvi, el ratolí NOD

expressa immunoglobulines que pertanyen a l'haplotip "b". Aquest fet permet detectar l'expressió del transgen en els limfòcits B del ratolí 280.IgH.NOD.

A la figura 29 es mostra els nivells d'expressió del transgen que codifiquen per la cadena pesada de la immunoglobulina M. Com es pot observar l'expressió del transgen és correcta. A més, l'expressió del transgen genera exclusió al·lèlica dels gens de les immunoglobulines endògenes.

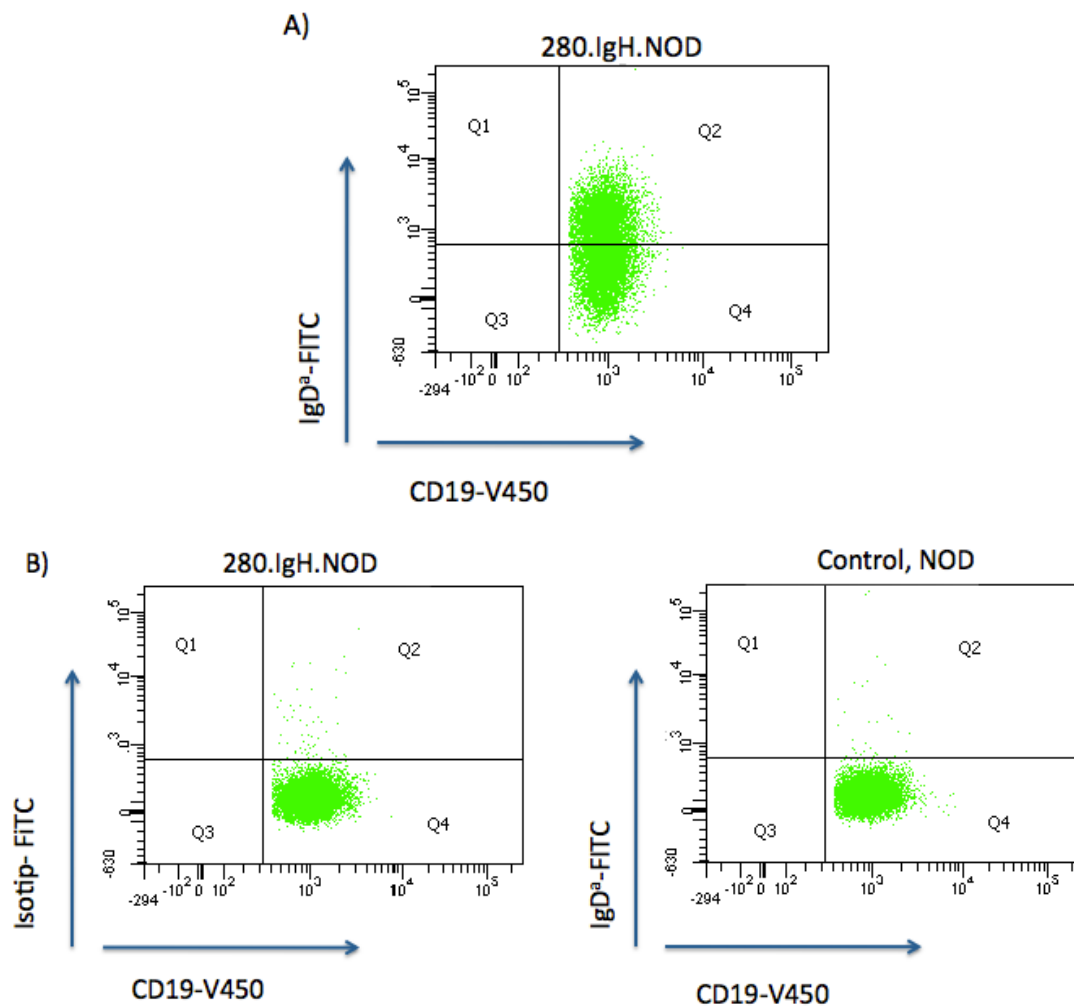


**Figura 29.-** Imatge representativa de l'anàlisi de l'expressió de IgM de membrana en els limfòcits B de ratolins femella de la soca 280.IgH.NOD de 9 setmanes d'edat. Es mostra el marcatge de la immunoglobulina transgènica marcada amb PE contraposada al marcatge de la immunoglobulina endògena marcada amb APC. S'observa el marcatge resultant d'un ratolí de la soca transgènica i el d'un ratolí NOD.

## 5.2. Expressió de la IgD

També es va comprovar la correcta expressió de la IgD transgènica en els limfòcits B del ratolí 280.IgH.NOD. En aquest cas es va utilitzar un anticòs que reconeixia per la immunoglobulina D de l'haplotip "a" per analitzar l'expressió del transgen. Com a control es va realitzar la mateixa tinció en un ratolí NOD i un anticòs del mateix isotip marcat amb el mateix fluorocrom.

A la figura 30 es mostra com en el ratolí 280.IgH.NOD s'observa marcatge positiu amb l'anticòs que reconeix l'haplotip "a" en les IgD, mentre que no s'observa ni en la mateixa tinció per NOD, ni per l'isotip.



**Figura 30.- A)** Imatge representativa de l'expressió del transgen per a la cadena pesada de la IgD a la membrana dels limfòcits B de ratolins femella de la soca 280.IgH.NOD a 9 setmanes d'edat. Es mostra el marcatge de la immunoglobulina transgènica marcada amb FITC, en els limfòcits B (CD19+) marcats amb V450. **B)** S'observa el control de la tinció on s'ha utilitzat un anticòs del mateix isotip marcat amb FITC en limfòcits de ratolí transgènic, i el control amb limfòcits de la soca NOD (haplotip "b") marcats amb l'anticòs IgD específic per a l'haplotip "a".

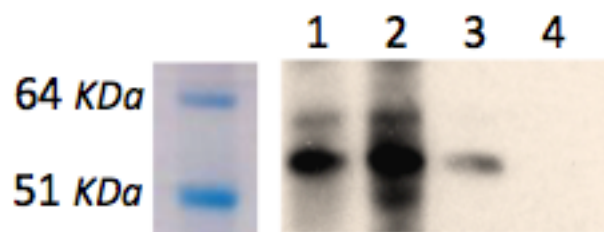
### 5.3. Producció d'immunoglobulina secretada

Per avaluar la producció d'immunoglobulina secretada es va testar el sèrum d'animals de la soca que expressava el transgen mitjançant *western blot*. Com a mostra es va utilitzar una periferina recombinant generada en el nostre laboratori que duia unida una cua d'histidines. Es va utilitzar un anticòs contra histidina com



a control positiu, també es va utilitzar el sèrum d'un ratolí NOD com a control. I un control negatiu, a on només es va incubar la mostra amb l'anticòs secundari.

Els resultats van mostrar que el sèrum del ratolí 280.IgH.NOD presentava anticossos que reconeixien la periferrina (Figura 31). Aquests resultats, juntament amb els estudis de l'expressió de IgM i IgD, ens indicaven que tot i haver alterat transgènicament el BCR, els animals de la soca 280.IgH.NOD eren capaços de presentar immunoglobulines transgèniques a la seva membrana i secretar-les a la sang.



**Figura 31.-** Detecció de la periferrina recombinant mitjançant Western-Blot. A l'esquerra de la imatge s'observa el marcador de pes molecular (Seebblue plus II) en KDa. Carril 1: sèrum NOD d'una femella de 12 setmanes d'edat; Carril 2: sèrum 280.IgH.NOD d'una femella de 12 setmanes d'edat; Carril 3: control positiu, anticòs contra la cua d'histidines; Carril 4: control negatiu, sense sèrum.

## 6.-Desenvolupament de la malaltia en la soca 280.IgH.NOD

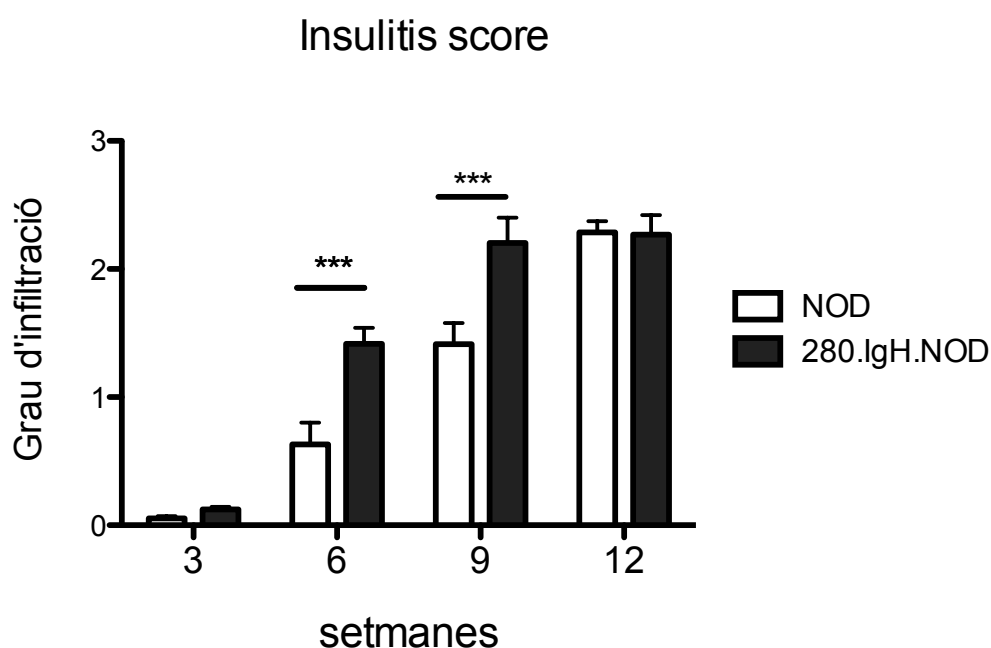
Un cop estudiada la correcta expressió del transgen i la supressió de l'expressió de la periferrina es va passar a estudiar la incidència de la malaltia en les femelles de la soca 280.IgH.NOD. Amb aquest objectiu es va realitzar un estudi de l'infiltrat leucocitari (*insulitis score*) a 3, 6, 9 i 12 setmanes i el seguiment de la incidència de la malaltia fins a les 35 setmanes.

Una vegada confirmat el bon funcionament i l'especificitat antigènica del transgen, vam estudiar l'efecte de l'expressió del transgens en l'evolució de la malaltia. Inicialment, es va estudiar el ratolí 280.IgH.NOD. Aquest ratolí només porta un dels dos transgens de la immunoglobulina anti-periferrina. El ratolí portador del transgen que codifica per la cadena pesada del BCR que reconeix la periferrina, té un increment de precursors de limfòcits B amb especificitat antigènica per la periferrina, sense arribar a ser un animal monoclonal, fet que sí que es donaria si s'expressés la cadena lleugera anti-periferrina de l'hibridoma H280 al mateix temps.

## 6.1. Evolució de la infiltració

En aquesta soca, igual que s'havia fet per la soca NOD.Per-/-, es va estudiar l'evolució de l'infiltrat leucocitari en les primeres setmanes de vida dels animals.

Els resultats obtinguts en la soca 280.IgH.NOD mostraven un increment de la insulitis a les 6 i 9 setmanes d'edat respecte als seus germans de camada no transgènics. (Figura 32). Aquesta diferència esdevé estadísticament significativa en els dos casos (6 setmanes  $p\text{-value}<0.0001$ , 9 setmanes  $p\text{-value}<0.0001$ ). Fet que apunta que aquesta soca presenta una acceleració de la malaltia respecte a la soca NOD.



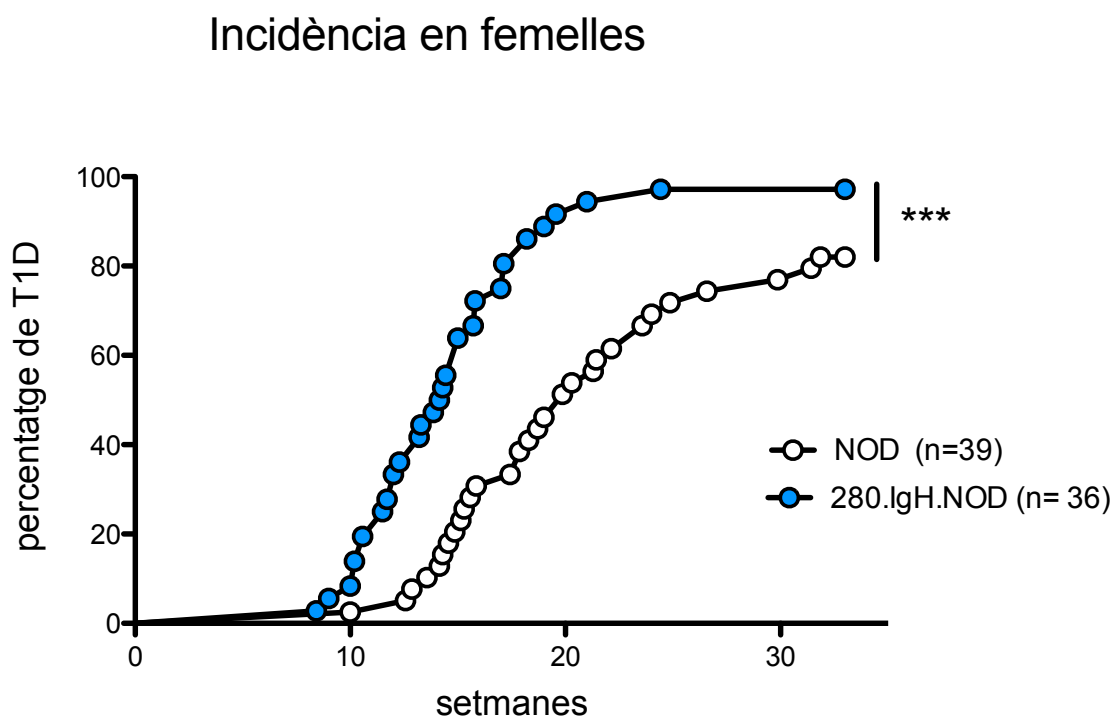
**Figura 32.-** Grau d'infiltració (insulitis score) de ratolins femelles de les soques NOD i 280.IgH.NOD. Els resultats fan referència a 3 femelles per grup. Les diferències més importants s'observa a les 6 i 9 setmanes d'edat, amb significança estadística en els dos casos (6 setmanes  $p\text{-value}<0.0001$ , 9 setmanes  $p\text{-value}<0.0001$ ).

## 6.2. Incidència de la diabetis de la soca 280.IgH.NOD

Després d'estudiar l'evolució de l'infiltrat leucocitari en l'etapa prèvia al debut de la diabetis en la soca 280.IgH.NOD, es va estudiar la incidència de diabetis acumulada en un seguiment de 35 setmanes.

Els animals de la soca 280.IgH.NOD van presentar una incidència final de la malaltia superior i accelerada respecte a les seves germanes de camada no transgèniques. Així, és interessant destacar el fet que en la soca 280.IgH.NOD els animals debuten en la diabetis en edats més joves, i amb una incidència situada entorn del 97% mentre que en les femelles NOD se situava al voltant del 84%.

La diferència entre les corbes que mostren l'evolució de la malaltia entre les dues soques és estadísticament significativa amb un valor de  $p\text{-value} < 0.0001$  (Figura 33).



**Figura 33.-** Incidència de la T1D en femelles de la soca 280.IgH.NOD. Es mostren els percentatges d'incidència de la malaltia en cada una de les soques

## 7.- Incidència de la diabetis en la soca 280.IgH.NOD.Per-/-

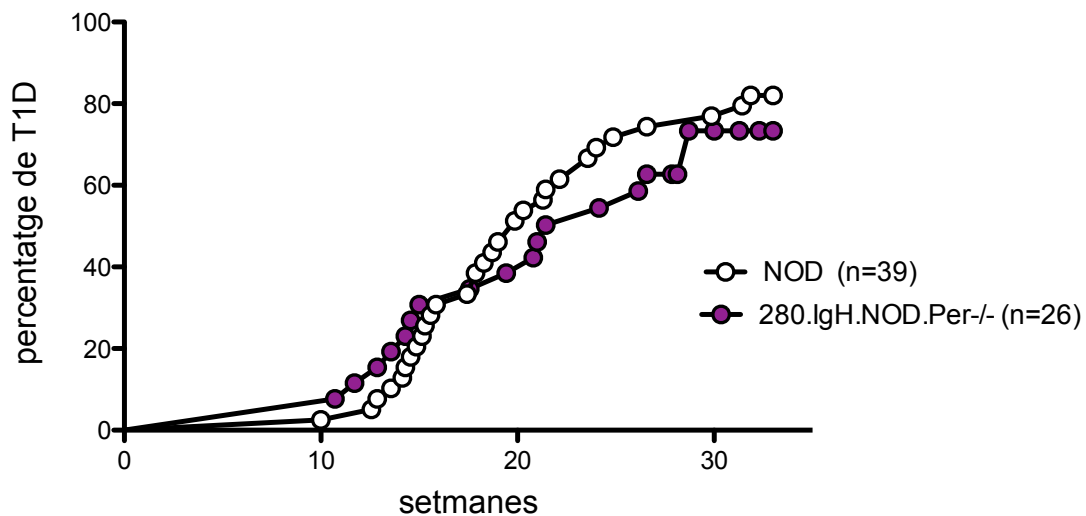
Un cop estudiades les soques 280.IgH.NOD i NOD.Per-/- per separat, i per acabar d'acabar de confirmar els resultats anteriors, es va estudiar la incidència de la soca resultant de la combinació de les dues anteriors. La soca 280.IgH.NOD.Per-/- que combina el knockout per la periferina i transgènic per la cadena pesada del receptor de la cèl·lula B.

Els resultats de la soca 280.IgH.NOD.Per-/- van mostrar una incidència final molt similar a la soca NOD. La incidència acumulada de la malaltia de la soca 280.IgH.NOD.Per-/- se situa lleugerament per sota la incidència de la soca NOD i la soca NOD.Per-/-, entorn del 73%. No obstant això, i com s'observa a la figura 324 les corbes d'incidència de la malaltia són molt semblants en les dues soques, per tant, les diferències observades entre les incidències podrien ser explicades per la diferència en la mida mostral.

A partir dels resultats obtinguts de la incidència de la soca 280.IgH.NOD.Per-/- es confirma, com s'apuntava en els estudis realitzats en la soca 280.IgH.NOD, que els limfòcits B reactius contra la periferina tenen un paper rellevant en el desenvolupament de la malaltia. Ja que aquests mateixos limfòcits transgènics si no es troben amb la periferina no són capaços d'accelerar la malaltia, com sí que s'ha vist en la soca 280.IgH.NOD.

Un cop estudiada les diferències fenotípiques d'aquesta soca, la soca 280.IgH.NOD.Per que només expressa la cadena pesada el receptor del BCR, s'analitzarà la soca 280.IgH.IgL.NOD que expressa el BCR transgènic anti-periferina complet, és a dir, que expressa la cadena pesada i la cadena lleugera de forma transgènica, ambdues amb especificitat contra la periferina.

## Incidència en femelles



**Figura 34 .-** Incidència de la T1D en femelles de la soca 280.IgH.NOD.Per-/- . Es mostren els percentatges d'incidència de la malaltia en cada una de les soques.

## 8.- Estudi funcional i fenotípic dels limfòcits B a melsa del ratolí 280.IgH.NOD

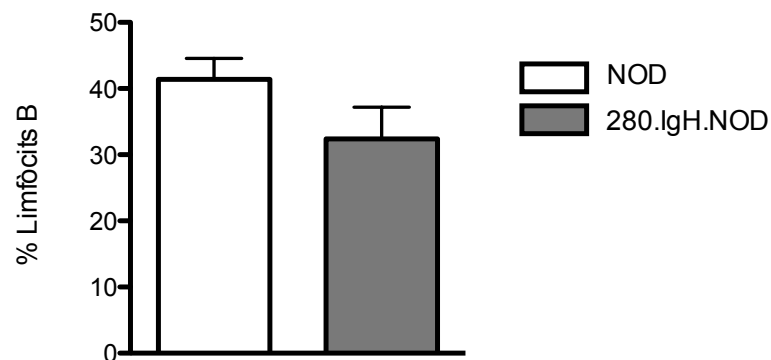
Després d'observar que els limfòcits B contra periferina tenen un paper rellevant en el desenvolupament de la malaltia es va estudiar més a fons les característiques funcionals i fenotípiques.

### **8.1. Estudi dels limfòcits B presents a melsa**

Abans de portar a terme els estudis funcionals i fenotípics, es va analitzar quina era la proporció de limfòcits B presents a les melses d'animals transgènics comparats amb la dels ratolins de la soca NOD.

Els resultats van mostrar que els ratolins de la soca 280.IgH.NOD presenten una proporció menor de limfòcits B en comparació amb els ratolins de la soca NOD (Figura 35). No obstant això, les diferències que s'observen entre les dues soques no són estadísticament significatives.

### Limfòcits B presents a melsa



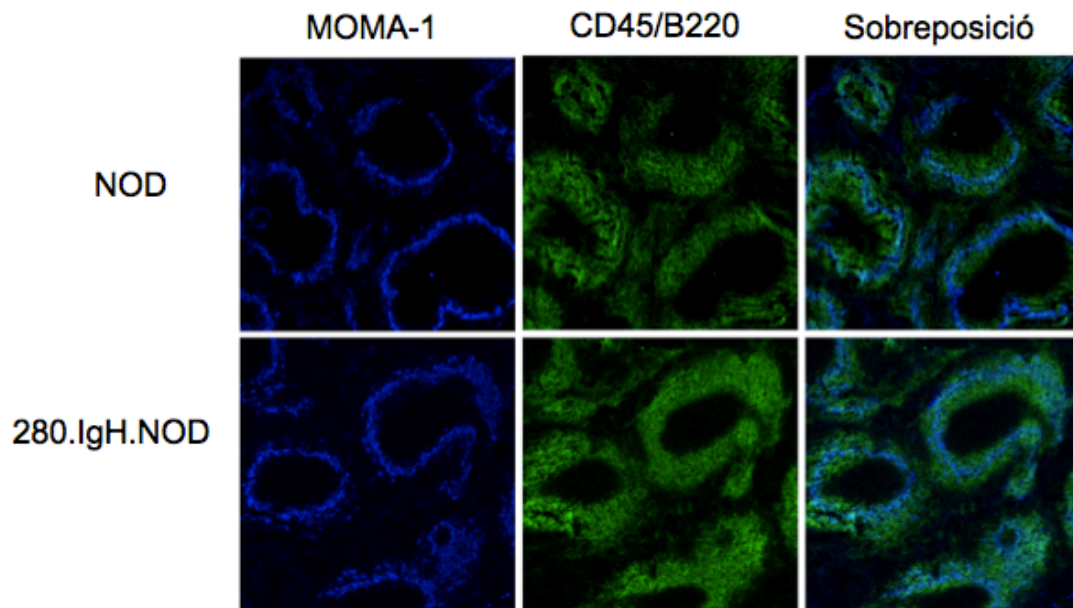
**Figura 35.-** Percentatge dels limfòcits B presents a la melsa en ratolins de la soca 280.IgH.NOD i NOD. Estudi realitzat en 4 femelles de 8 setmanes d'edat.

## 8.2. Distribució dels limfòcits B a la melsa

A continuació es va comparar la distribució dels limfòcits B en les melses dels ratolins de la soca NOD amb els de la soca transgènica 280.IgH.NOD, per analitzar si hi havia diferències. Per realitzar aquesta comparació es va fer un estudi immunohistològic de la melsa per immunofluorescència.

Es van tenyir els macròfags metalofílics per tal de poder distingir els limfòcits B de la zona marginal dels de la zona fol·licular, ja que aquest estan situats a la franja que separa un tipus cel·lular de l'altre.

Els resultats feien intuir que hi havia diferències entre les poblacions de limfòcits B presents a les melses de la soca 280.IgH.NOD en comparació a les melses dels seus germans no transgènics, ja que s'observava un engruiximent de la zona marginal en els animals transgènics (Figura 36). Malgrat es veien diferències entre ambdues soques, va ser necessari dur a terme posteriors estudis mitjançant citometria de flux per tal de poder quantificar les diferències observades en l'estudi immunohistològic.



**Figura 36.-** Distribució dels limfòcits B (verd) en melsa dels ratolins 280.IgH.NOD i NOD. femelles de 12 setmanes de vida. A la tinció es marquen els macròfags metal·lofílics (blau) que permeten delimitar la zona marginal i la fol·licular. Imatges preses a 30 augments.

### 8.3. Subpoblacions de limfòcits B a melsa

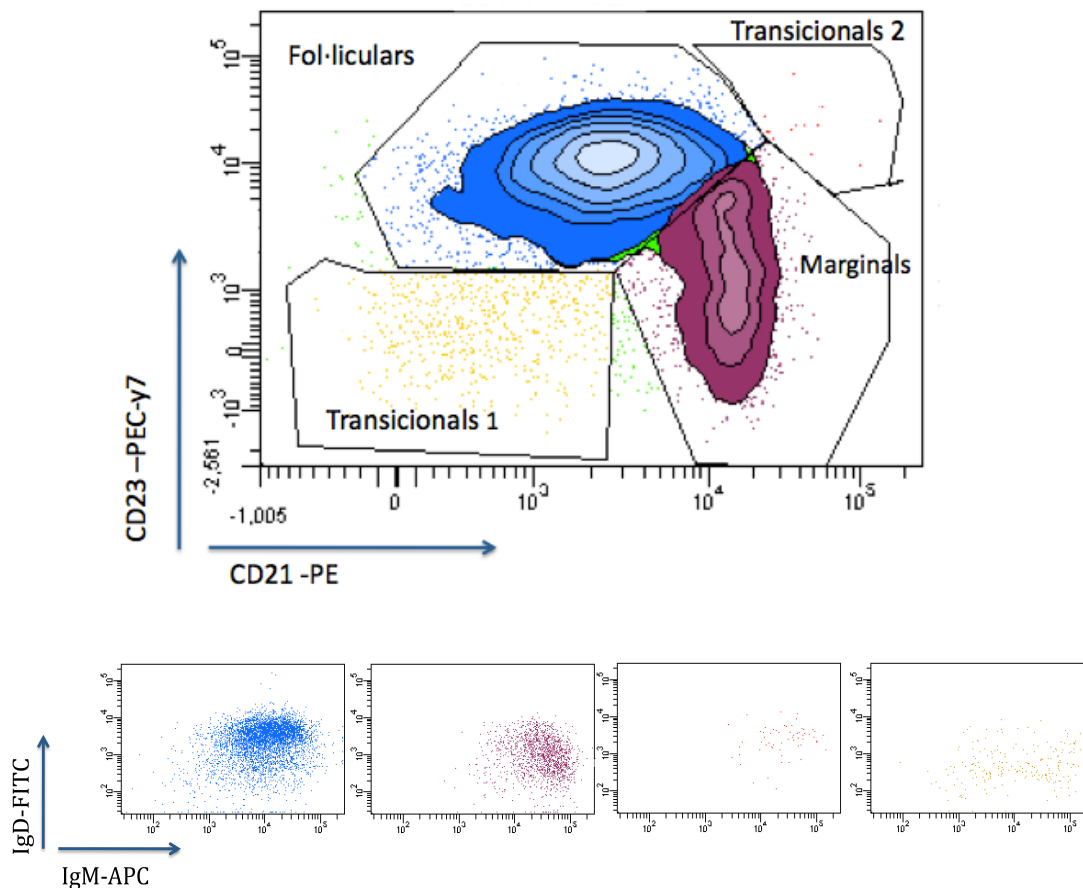
Per confirmar les variacions en les subpoblacions de limfòcits B que apuntaven els resultats de les immunofluorescències, es van analitzar la proporció de les diferents subpoblacions per citometria de flux.

També es van avaluar les possibles variacions en les subpoblacions de limfòcits B de melsa en funció de l'edat de l'animal, per això es van analitzar els limfòcits a 5, 10 i 15 setmanes d'edat.

#### 8.3.1. Limfòcits B fol·liculars, de zona marginal, transicionals de tipus 1 i transicionals de tipus 2

Per dur a terme l'estudi de les diferents subpoblacions de limfòcits B de melsa, primerament es van seleccionar els limfòcits per volum i complexitat interna de la cèl·lula, després es van seleccionar els positius per CD19 que identifiquen els limfòcits B. Finalment es van seleccionar les cèl·lules en funció de l'expressió dels marcadors CD21 i CD23, que van delimitar les diferents subpoblacions. També es va comprovar l'expressió de IgM i IgD de les diferents subpoblacions per confirmar-les. Utilitzant aquests marcadors es van poder estudiar els limfòcits B

fol·liculars, de zona marginal, transicionals de tipus 1 i transicionals de tipus 2, com s'observa a la figura 37. En aquesta figura s'observa com es distingeixen clarament les dues poblacions majoritàries (fol·liculars i marginals).



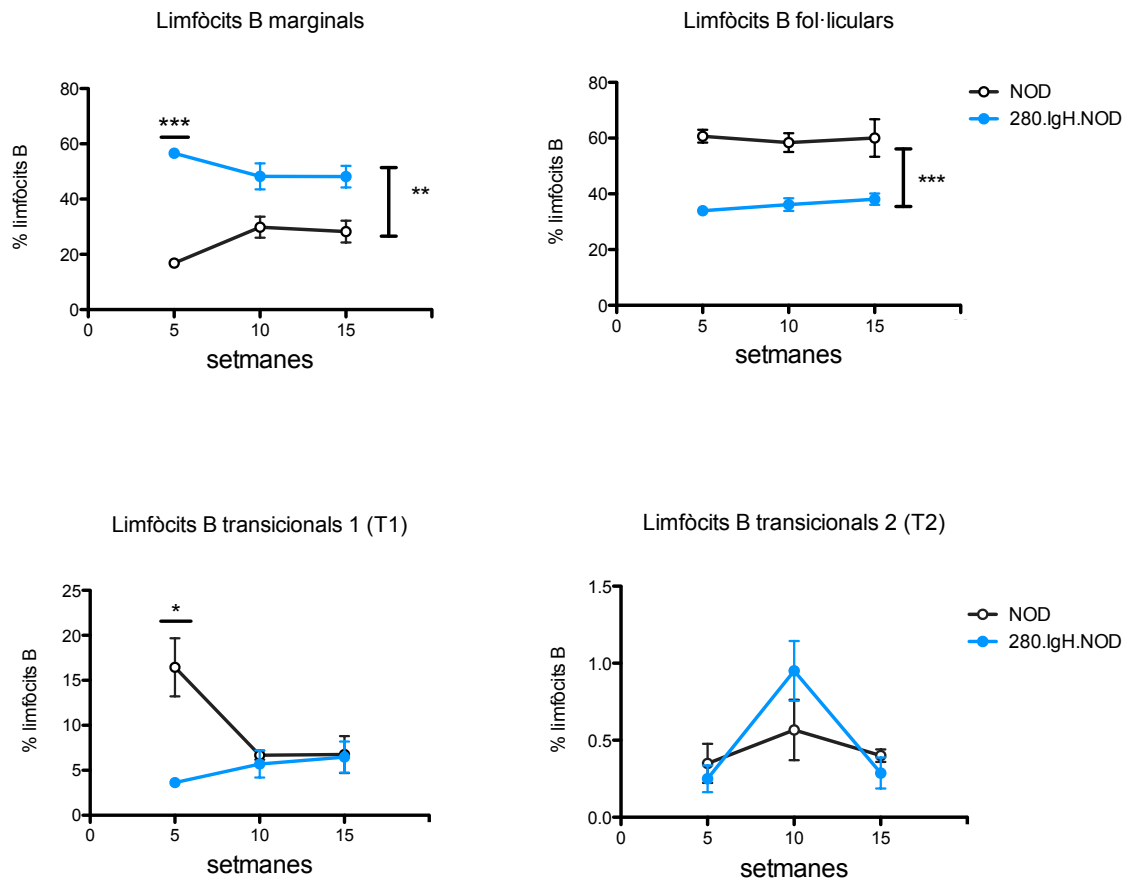
**Figura 37.-** Esquema que il·lustra la selecció de les subpoblacions dels limfòcits B en funció de l'expressió dels marcadors CD21, CD23, IgM i IgD. En la imatge superior mostra les diferents subpoblacions: fol·liculars (blau); marginals (granat) T1 (groc) i T2 (vermell). En les imatges de la part inferior es mostren els nivells d'expressió de IgM i IgD per a cada una de les diferents poblacions.

Els resultats van indicar que els ratolins de la soca 280.IgH.NOD presentaven una disminució de la població de limfòcits B fol·liculars ( $p\text{-value}<0.0001$ ) en deprimint dels limfòcits de la zona marginal que es troben augmentats en aquesta soca ( $p\text{-value}=0.0063$ ), com s'observa en la figura 38. La diferència entre les poblacions de cèl·lules marginals és encara major a les 5 setmanes d'edat ( $p\text{-value}<0.0001$ ).

En referència a les poblacions de transicionals, només s'observen diferències a les 5 setmanes d'edat en la subpoblació de limfòcits transicionals de tipus 1. Els ratolins de la soca NOD presenten una major població de transicionals de tipus 1



en comparació els ratolins transgènics ( $p\text{-value}=0.021$ ). En les altres edats, les proporcions d'aquest subtipus cel·lular són molt semblants. El mateix s'observa en la subpoblació de limfòcits B transicionals de tipus 2, on no s'observen diferències entre una i altra soca.



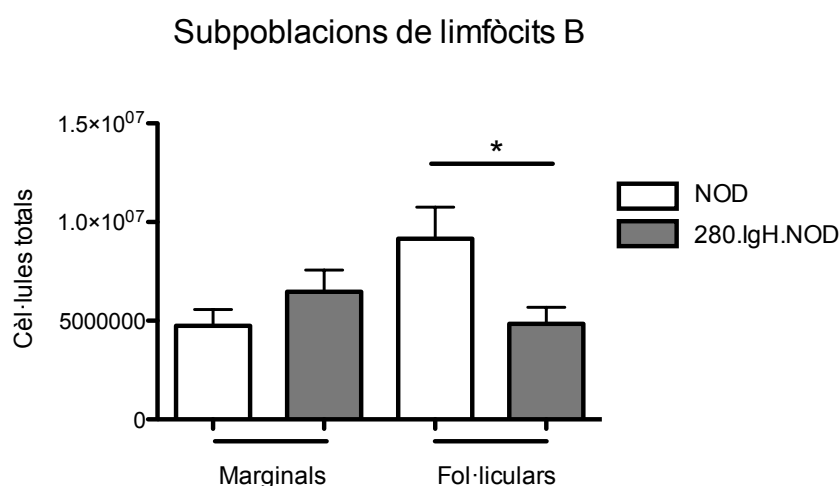
**Figura 38.-** Evolució a diferents edats (5, 10 i 15 setmanes) de limfòcits B fol·liculars, marginals, T1 i T2. Els limfòcits de ratolí 280.IgH.NOD estan marcats en negre i els NOD en blau. Destaca l'augment dels limfòcits B marginals en els transgènics en comparació amb la disminució dels limfòcits B fol·liculars. Cada punt representa la mitjana (amb desviació estàndard) de 5 femelles.

### 8.3.1.1. Estudis dels limfòcits fol·liculars i de zona marginal en nombre absolut

Un cop analitzades les proporcions de les diferents subpoblacions cel·lulars, es va analitzar si els canvis en les proporcions de les diferents subpoblacions de limfòcits B també s'observaven en el nombre total dels limfòcits.

Es van comptar els nombres totals de les diferents subpoblacions i els resultats obtinguts van confirmar que la soca 280.IgH.NOD presenta una disminució significativa dels limfòcits B fol·liculars ( $p\text{-value}=0.02$ ), com s'havia observat anteriorment. En canvi, respecte a la població dels limfòcits B de zona marginal, s'observa un increment d'aquests limfòcits en la soca transgènica, tanmateix, no representa una diferència significativa (Figura 39).

Del conjunt d'aquests resultats se n'extreu que en la soca 280.IgH.NOD hi ha un canvi en la proporció de limfòcits fol·liculars i limfòcits de zona marginal presents a melsa. Aquest canvi percentual s'explica a causa d'una reducció en el nombre total de limfòcits fol·liculars presents en la soca transgènica, i a una tendència a l'alça de la població de limfòcits marginals, tot i que aquesta última sense significança estadística.

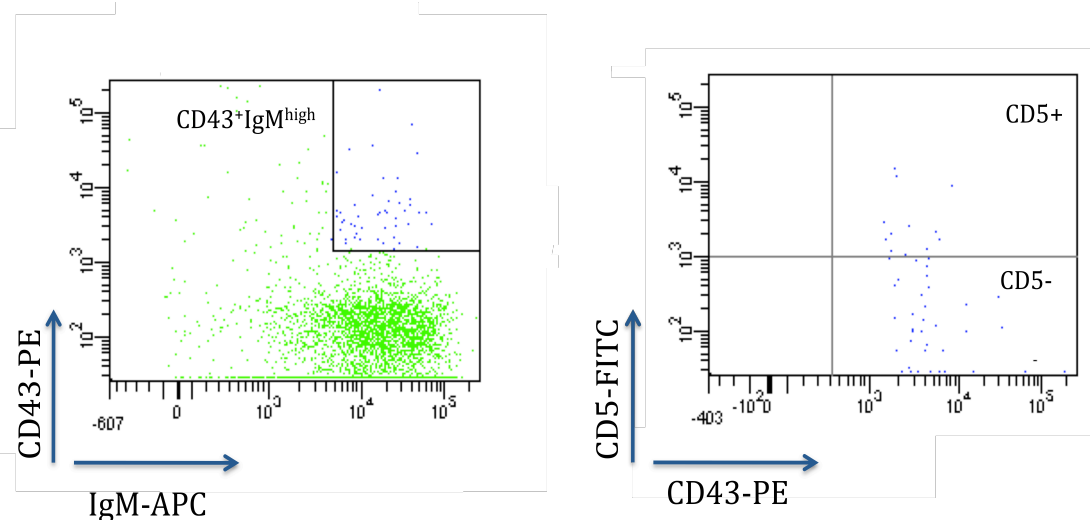


**Figura 39.-** Valors absoluts dels limfòcits presents a melsa i en les poblacions de limfòcits B fol·liculars i marginals. Estudi realitzat en 4 femelles de 8 setmanes d'edat.

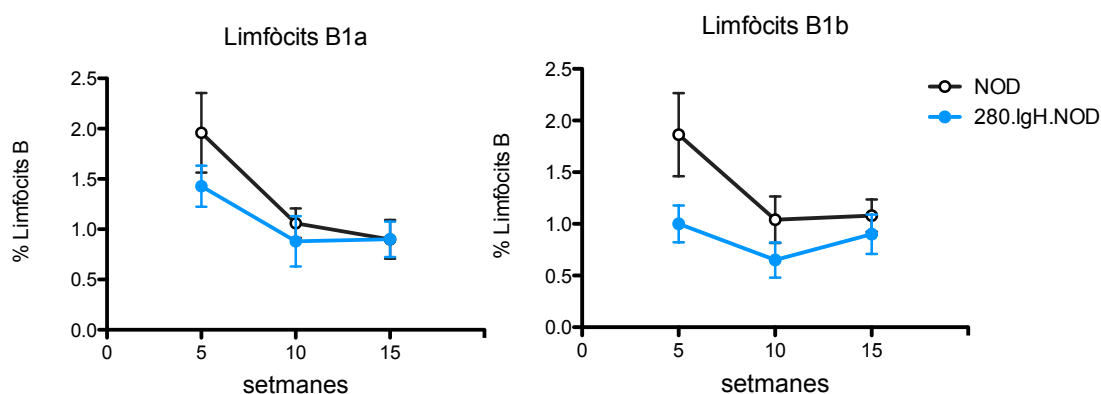
### 8.3.2. Limfòcits B1a i B1b

Es van estudiar altres subpoblacions minoritàries presents a la melsa com són les subpoblacions de limfòcits B1a i B1b. Es van analitzar aquestes subpoblacions mitjançant ciotmetria de flux. Per analitzar aquestes poblacions primerament es van seleccionar els limfòcits CD19 positius, a continuació, es van seleccionar els positius per CD43 i que a la vegada expressaven alts nivells de IgM. Finalment, es va fer la distinció de B1a i B1b en funció de l'expressió de CD5. Els limfòcits B1a expressen CD5, mentre que els limfòcits B1b no l'expressen (Figura 40).

Es va observar que el valor de les poblacions de cèl·lules B1a i B1b en les dues soques de ratolins era molt semblant. En totes dues soques la població de cèl·lules B1a i la de B1b representen entorn del 2% dels limfòcits B totals de la melsa. Amb l'edat s'observa una disminució d'aquestes dues poblacions en ambdues soques (Figura 41).



**Figura 40.-** Esquema d'anàlisi dels limfòcits B1a i B1b per citometria de flux. Es mostra la selecció en funció de l'expressió de les molècules CD43 i IgM, en nivells alts, i l'expressió de CD5 per diferenciar B1a (CD5+) i B1b (CD5-).



**Figura 41.-** Evolució a diferents edats (5, 10 i 15 setmanes) de limfòcits B1a i B1b. Els limfòcits B de les femelles de ratolí NOD estan representats amb blau i els del ratolí 280.IgH.NOD en negre. S'observa que aquestes poblacions disminueixen amb l'edat de forma semblant en les dues soques. Cada punt representa la mitjana (amb desviació estàndard) de 5 animals.

## 9.- Diferències fenotípiques entre els limfòcits B procedents de la soca 280.IgH.NOD i la soca NOD

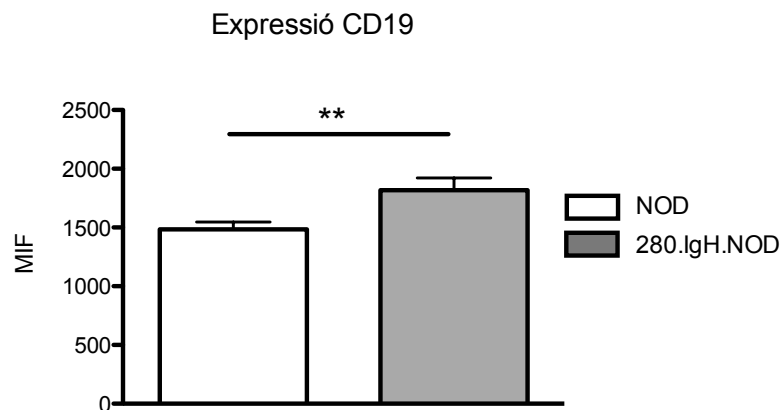
Després d'observar les diferències entre les poblacions presents a melsa entre les dues soques, es van avaluar possibles diferències fenotípiques dels limfòcits B. Canvis en l'expressió de determinades molècules a superfície, permetrien caracteritzar els limfòcits transgènics i deixar entreveure quin és el seu paper en l'acceleració de la malaltia.

Es va comparar l'expressió d'aquestes en els limfòcits B procedents de melsa de les soques NOD i 280.IgH.NOD. Per la realització d'aquests estudis es van utilitzar animals de 12 setmanes d'edat.

### **9.1. Expressió de la molècula CD19**

Per analitzar l'expressió de la molècula CD19 es van seleccionar els limfòcits CD19+ i es va estudiar la mediana d'intensitat de fluorescència (MIF) que emetia el fluorocrom unit a l'anticòs que es va utilitzar per seleccionar les cèl·lules. L'expressió de la molècula CD19 està relacionada amb l'activació dels limfòcits B, per tant, es va creure que era important analitzar les possibles diferències d'activació entre els limfòcits procedents de la soca transgènica i els procedents de la soca NOD.

Els resultats obtinguts van mostrar un augment significatiu en l'expressió de CD19 en els limfòcits B procedents de melsa de la soca 280.IgH.NOD, respecte als mateixos limfòcits dels seus germans de camada no transgènics ( $p\text{-value}=0.01$ ). En conclusió, aquests resultats suggeririen que els limfòcits B procedents de la soca transgènica estarien més activats que els procedents de la soca NOD (Figura 42).



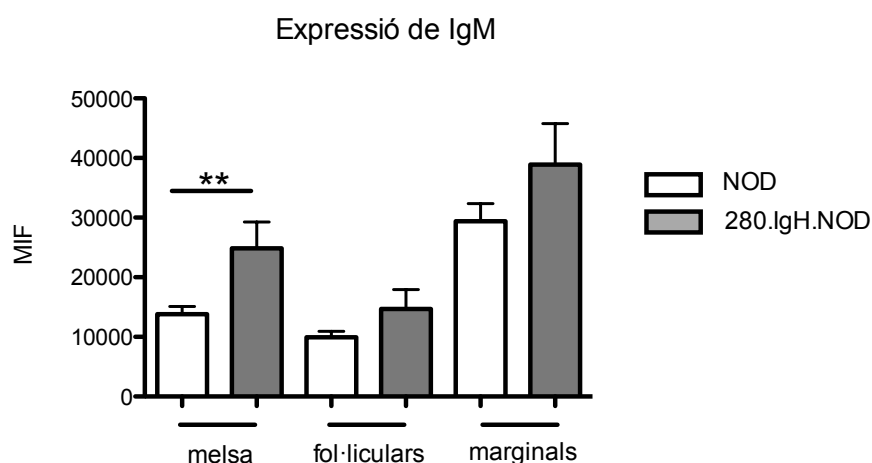
**Figura 42.-** Expressió de la molècula de CD19 en funció de la mediana d'intensitat de fluorescència en limfòcits B procedents de la soca 280.IgH.NOD i NOD. Estudi realitzat amb 10 femelles per grup de 12 setmanes d'edat.

## 9.2. Expressió de la IgM

Es va voler estudiar més a fons l'expressió de les immunoglobulines de superfície. Concretament, els nivells d'immunoglobulina M que es trobaven a la membrana dels limfòcits B, ja que aquesta molècula està estretament relacionada amb l'activació i homeòstasi dels limfòcits B.

Per estudiar l'expressió de les molècules IgM primer es van seleccionar els limfòcits CD19 positius i després es van marcar les molècules IgM amb un anticòs. En aquest cas es van utilitzar anticossos diferents en funció de la soca. Es va utilitzar un anticòs conjugat amb biotina que reconeixia l'haplotip "a" de la cadena pesada de la immunoglobulina pels ratolins de la soca 280.IgH.NOD, i un anticòs que reconeixia l'haplotip "b" de la cadena pesada de la immunoglobulina pels ratolins NOD. En els dos casos es va utilitzar streptavidina conjugada a un fluorocrom que va permetre estudiar la MIF.

Hi havia la possibilitat que les diferències d'expressió de la IgM observades en els limfòcits B procedents de melsa fossin conseqüència de les diferències poblacionals observades entre les dues soques (apartat 8.3.1). Per tant, es van estudiar els nivells de IgM en funció de les subpoblacions (Figura 43). Els resultats van indicar que l'expressió de IgM eren semblants (amb una tendència a ser més alta, encara que no significativament estadística, en els ratolins transgènics) en les subpoblacions de limfòcits B fol·liculars i de zona marginal procedents de melsa en de les dues soques, la soca 280.IgH.NOD i la NOD.

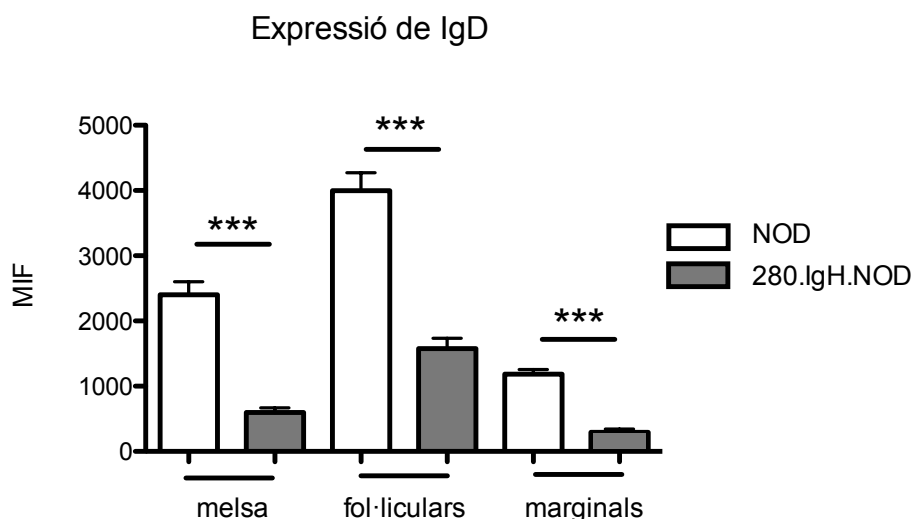


**Figura 43.-** Expressió de la molècula de IgM en funció de la mediana d'intensitat de fluorescència (MIF) en les subpoblacions de limfòcits B fol·liculars i marginals. Estudi realitzat amb 10 femelles per grup de 12 setmanes d'edat.

### 9.3. Expressió de la IgD

També es van analitzar els nivells d'expressió de la immunoglobulina D a membrana. Per analitzar l'expressió de les molècules IgD es van seleccionar els limfòcits CD19 positius, i després es van marcar les molècules IgD amb un anticòs. En aquest cas, igual que el que passava en l'estudi de l'expressió de IgM es van utilitzar anticossos diferents en funció de l'haplotip de cada una de les soques.

Es va evaluar el fet que les diferències d'expressió de la IgD observades en els limfòcits B procedents de melsa fossin conseqüència de les diferències poblacionals observades entre les dues soques (apartat 8.3.1). Per tant, es van estudiar els nivells de IgD en funció de les subpoblacions (Figura 44). Els resultats van indicar que l'expressió de IgD en els limfòcits procedents de la soca 280.IgH.NOD eren inferiors a la soca NOD en diferents subpoblacions presents a la melsa. En aquest cas, es va confirmar que les diferències observades en la melsa eren en part degudes al canvi poblacional, però també degut a la diferència d'expressió de la molècula IgD, ja que tant en els limfòcits B fol·liculars com en els marginals l'expressió de la IgD es trobava disminuïda en comparació amb els limfòcits B que provenien de la soca NOD (fol·liculars  $p\text{-value}<0,001$ , marginals  $p\text{-value}<0,0001$ ).



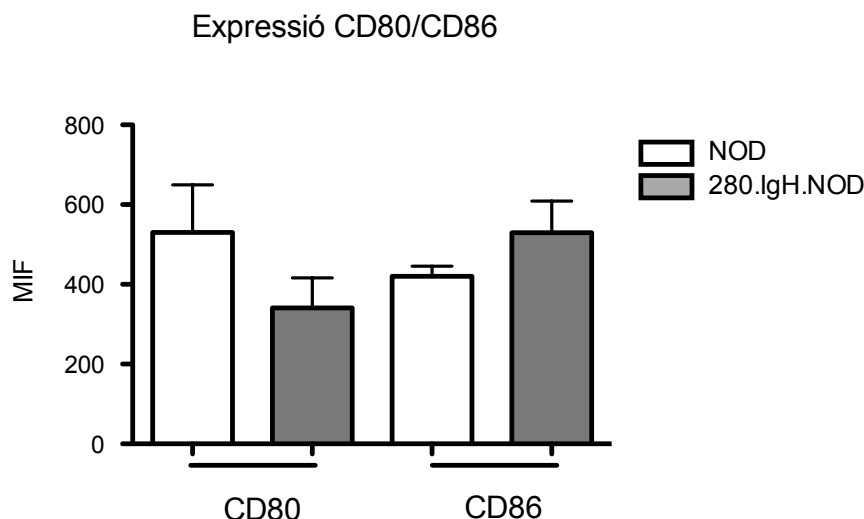
**Figura 44** .- Expressió de la molècula de IgD en funció de la mediana d'intensitat de fluorescència en les subpoblacions de limfòcits B fol·liculars i marginals. Estudi realitzat amb 10 femelles per grup de 12 setmanes d'edat

#### 9.4. Expressió de molècules coestimuladores CD80 i CD86

Per analitzar el paper dels limfòcits B com a cèl·lules presentadores d'antigen es va estudiar l'expressió de les molècules B7 presents a la superfície cel·lular, i es va comparar l'expressió d'aquestes molècules amb la dels limfòcits B presents a la melsa, en les dues soques de ratolí.

Per estudiar l'expressió de les molècules B7 (CD80 i CD86), es van seleccionar els limfòcits CD19 positius, i es va analitzar la MIF que emetia el fluorocrom unit a l'anticòs que reconeixia les diferents molècules. Les molècules CD80 i CD86 són molècules coestimuladores, molècules necessàries per a què els limfòcits B portin a terme l'activació dels limfòcits T.

Els resultats van mostrar un lleuger descens en l'expressió de la molècula CD80 en els limfòcits B dels ratolins 280.IgH.NOD. Per altra banda, l'expressió de CD86 es trobava lleugerament incrementada, però en cap cas es van observar diferències significatives (Figura 45).



**Figura 45.-** Expressió de la molècula de CD80 i CD86 en funció de la mediana d'intensitat de fluorescència en limfòcits B procedents de melsa de la soca 280.IgH.NOD i NOD. Estudi realitzat amb 10 femelles per grup de 12 setmanes d'edat.

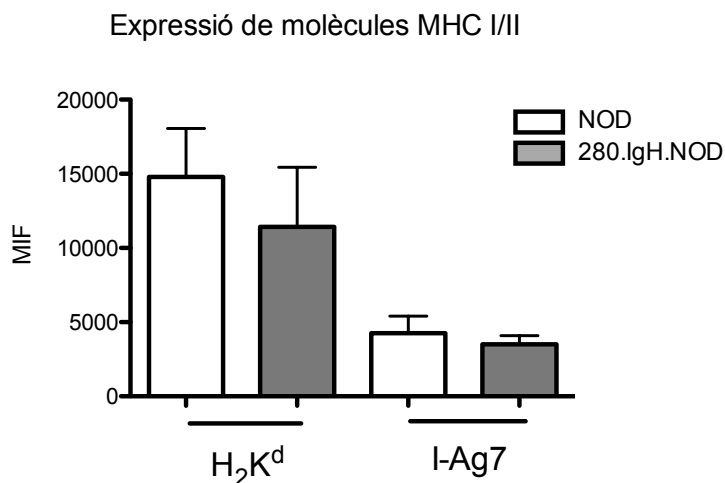
## 9.5. Expressió de molècules MHC I/ II

Es va voler aprofundir en l'estudi del paper dels limfòcits B com a cèl·lules presentadores d'antigen, per això es va analitzar l'expressió de les molècules de MHC de classe I i classe II de la superfície cel·lular dels limfòcits B. És a través d'aquestes molècules que els limfòcits B, i la resta de cèl·lules presentadores d'antigen, presenten els antígens als limfòcits T.

Per analitzar l'expressió de les molècules MHC de classe I ( $H_2K^d$ ) i MHC de classe II (IA- $g^7$ ), primer es van seleccionar els limfòcits CD19 positius, i posteriorment es va registrar la MIF que emetia el fluorocrom unit a l'anticòs que reconeixia cada una de les molècules.

Els resultats obtinguts van mostrar valors d'expressió de la molècula  $H_2K^d$  molt semblant en les dues soques. També es va observar valors semblants pel que fa l'expressió de la molècula IA- $g^7$  en les dues soques. Amb tot, s'observa una tendència, encara que no significativa, en els nivells d'expressió més baixos en ambdues molècules en ratolins 280.IgH.NOD (Figura 46).





**Figura 46.-** Expressió de la molècula de H<sub>2</sub>K<sup>d</sup> i IA-g7 en funció de la mediana d'intensitat de fluorescència en limfòcits B procedents de melsa de la soca 280.IgH.NOD i NOD. Estudi realitzat amb 10 femelles per grup a les 12 setmanes d'edat.

## 10.- Estudis *in vitro* de limfòcits B procedents de melsa

### **10.1. Proliferació cel·lular**

Per aprofundir en el paper que podien tenir els limfòcits B transgènics en la malaltia, es van realitzar estudis funcionals *in vitro*. Primerament, es va dur a terme estudis de proliferació dels limfòcits B, cultivant-los amb diversos estímuls. La proliferació es va mesurar a partir de la incorporació de timidina tritiada (3[H]-TdR) a les 48h postestimulació.

Els estímuls elegits van ser: el lipopolisacàrid (LPS) que indueix l'estimulació a través dels receptors "toll-like receptor-4" (TLR-4); l'anticòs monoclonal anti-CD40 més IL-4 que mimetitzaria una estimulació via cèl·lula T, i finalment, l'estimulació directa del BCR mitjançant un anticòs contra la cadena  $\mu$  del BCR.

Per realitzar aquest estudi van seleccionar els limfòcits B de melses de ratolins de 6 setmanes d'edat mitjançant selecció negativa. D'aquesta manera, es van purificar els limfòcits B i no es van veure alterats pel procés de selecció. Es van realitzar 3 repeticions amb 3 animals de cada soca.

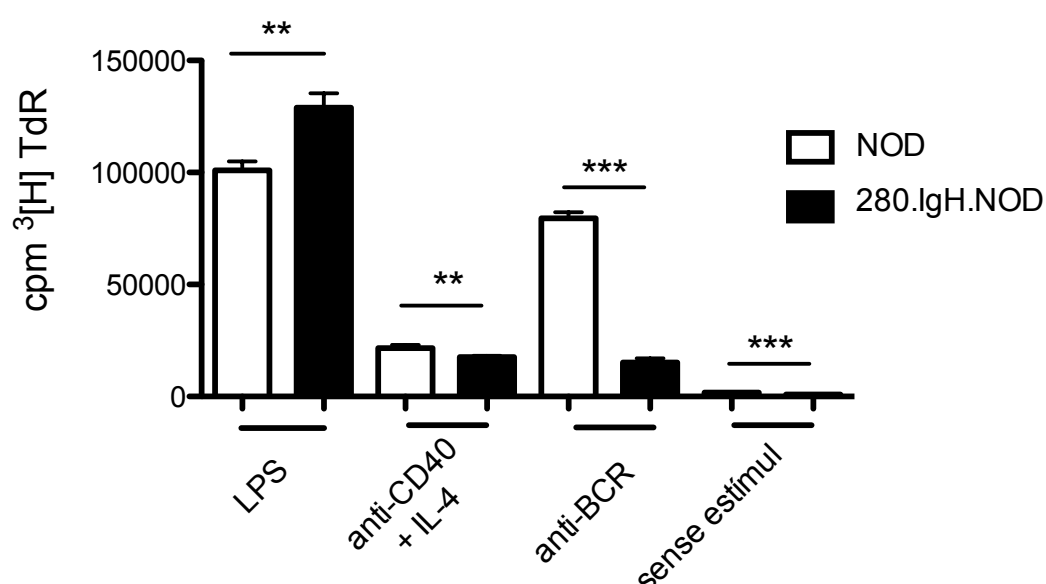
Els resultats obtinguts van mostrar comportaments significativament diferents dels limfòcits procedents dels animals transgènics en comparació dels seus germans no transgènics. Els resultats que van cridar més l'atenció, a causa de la resposta més diferent entre la soca transgènica i la soca NOD, van ser les proliferacions sota l'estímul a través del BCR.

Quan els limfòcits B transgènics reben l'estimulació a través del BCR s'observa que els limfòcits B transgènics no tenen la mateixa capacitat proliferativa que la dels seus germans no transgènics ( $p\text{-value}<0,001$ ) (Figura 47).

Respecte a la proliferació dels limfòcits cultivats amb l'estímul de LPS, s'observa que hi ha un augment de la proliferació dels limfòcits transgènics, en comparació dels seus germans de camada no transgènics ( $p\text{-value}=0,0033$ ). En canvi, quan s'observa les proliferacions sota l'estímul a través del CD40 proliferen més els limfòcits dels ratolins NOD, en comparació els limfòcits transgènics ( $p\text{-value}=0,0379$ ). També és interessant destacar que en condicions sense estímul els limfòcits B procedents de l'animal NOD proliferen més respecte als limfòcits B procedent dels animals que expressen el transgen ( $p\text{-value}<0,001$ ).

Aquests resultats apuntarien que els limfòcits B procedents de la soca transgènica no responen quan s'estimulen a través del BCR, de manera adopten un perfil d'anergia. No obstant això, a la vista d'aquests resultats tampoc es podria descartar que els resultats de l'estudi amb anti-BCR fos conseqüència d'una activació i mort massiva d'aquests limfòcits.

### Assaig de proliferació de limfòcits B



**Figura 47.-** Proliferació dels limfòcits B després de l'estimulació amb diferents estímuls. Les proliferacions van ser considerades en funció de les comptes per minut (cpm) resultant de la incorporació de la timidina tritiada per les cèl·lules. Estudi realitzat amb femelles 280.IgH.NOD i germans de camada no transgènics de 6 setmanes d'edat (tres repeticions i tres animals per grup).

## 10.2. Expressió de molècules coestimuladores i MHC

Es va analitzar el possible rol com a cèl·lules presentadores d'antigen es van estudiar més a fons les molècules coestimuladores i de MHC, tant de classe I com classe II. Concretament, es van analitzar els canvis d'expressió d'aquestes molècules en les diferents condicions d'estimulació, és a dir després de l'activació amb LPS, anti-CD40 més IL-4, o anti-BCR.

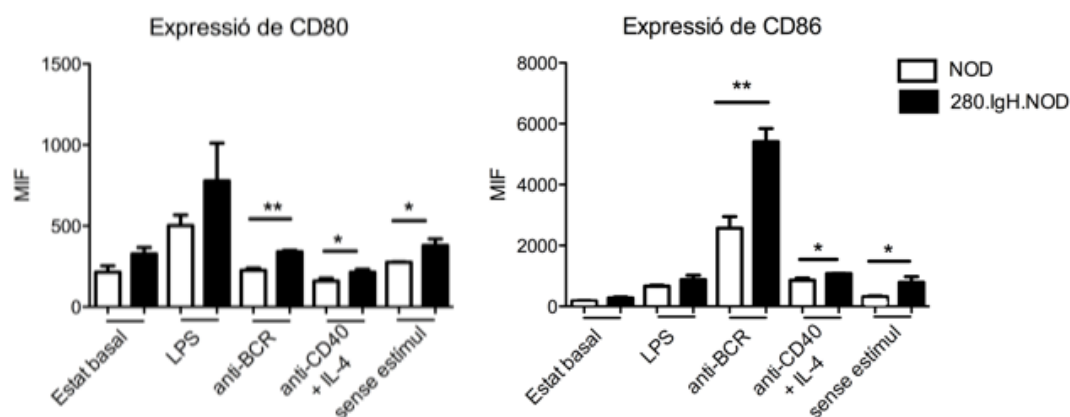
En els resultats s'observa que hi ha més diferències d'expressió de les molècules entre els animals transgènics i els seus germans de camada no transgènics quan aquests han estat cultivats amb l'estímul anti-BCR. És interessant remarcar que és també en la proliferació sota aquest estímul on s'observen les més diferències grans. Entrant en detall observem que la molècula CD80 (Figura 48) s'expressa més en els limfòcits dels animals transgènics ( $p\text{-value}=0.0023$ ) quan aquests han estat estimulats a través del BCR. Aquesta molècula també es troba més expressada en els limfòcits procedents de la soca transgènica quan s'estimula a través del CD40 i també en condicions sense estimular, a on també s'observen diferències estadístiques (sense estímul  $p\text{-value}=0.0395$ ; anti-CD40 més IL-4  $p\text{-value}=0.0463$ ).

En l'expressió de la molècula CD86 és a on s'observa el canvi d'expressió més significatiu. En les condicions on els limfòcits estan cultivats amb l'estímul anti-BCR augmenta l'expressió del CD86 en les dues soques, tot i que aquest és major en els limfòcits procedents dels animals transgènics ( $p\text{-value}=0.0078$ ). També s'observa un increment de l'expressió d'aquesta molècula en els limfòcits transgènics quan estan cultivats amb l'estímul anti-CD40 ( $p\text{-value}=0.042$ ), i en condicions sense estímul ( $p\text{-value}=0.0335$ ).

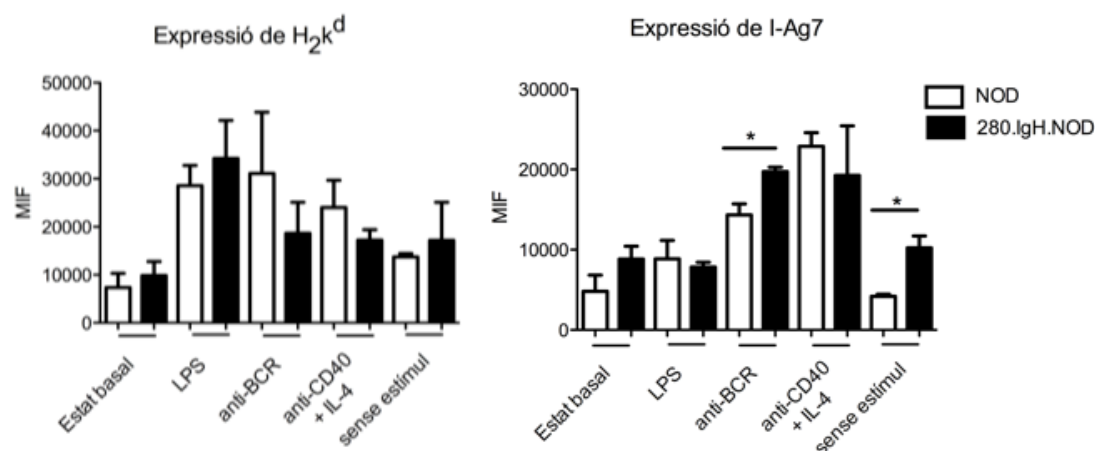
Respecte a l'expressió de la molècula de MHC de classe I (H2k<sup>d</sup>), s'observa que no hi ha diferències entre els limfòcits procedents dels animals transgènics i els procedents dels ratolins NOD, en cap de les condicions en què han estat cultivats, com s'observa en la figura 49. En canvi, quan els limfòcits van estar cultivats amb anti-BCR s'observen variacions d'expressió de la molècula de MHC de classe II (I-Ag7) amb valors més alts en limfòcits procedents de la soca 280.IgH.NOD ( $p\text{-value}=0,0212$ ). També s'aprecia un augment d'expressió de I-Ag7 quan els limfòcits han estat cultivats amb absència d'estímul ( $p\text{-value}=0,0155$ ).

El conjunt d'aquest resultats ens porten a pensar que els limfòcits B procedents de la soca transgènica, quan reben un estímul a través del BCR, adopten un fenotip de cèl·lula amb una alta capacitat d'actuar com a APC. L'increment d'expressió de molècules coestimuladores CD80 i CD86 a la seva superfície, a més de les

imolècules de MHC de classe II, afavoriria que aquestes cèl·lules actuessin com a cèl·lules presentadores d'antigen.



**Figura 48.-** Expressió de la molècula CD80 i CD86 en els limfòcits B NOD i 280.IgH.NOD en diferents condicions de cultiu: estat basal; cultiu amb LPS; cultiu amb anti-BCR; cultiu amb anti-CD40 +IL-4 i sense estimul. Estudi realitzat amb 3 femelles per grup a les 6 setmanes d'edat.



**Figura 49.-** Expressió de les molècules de MHC classe I (H<sub>2</sub>k<sup>d</sup>) i classe II (I-Ag7) en els limfòcits B NOD i 280.IgH.NOD en diferents condicions de cultiu: estat basal; cultiu amb LPS; cultiu amb anti-BCR; cultiu amb anti-CD40 +IL-4 i sense estimul. Estudi realitzat amb 3 femelles per grup a les 6 setmanes d'edat.

### 10.3. Estudi de la proliferació dels limfòcits B co-cultivats amb limfòcits T.

Per tal d'aprofundir en el paper dels limfòcits B anti-periferina en el decurs de la T1D, es van realitzar nous estudis de proliferació dels limfòcits B. En aquesta ocasió, es van realitzar assajos de proliferació dels limfòcits B procedents de la melsa sense realitzar la selecció negativa prèvia. És a dir, els limfòcits B van ser cultivats juntament amb els limfòcits T.

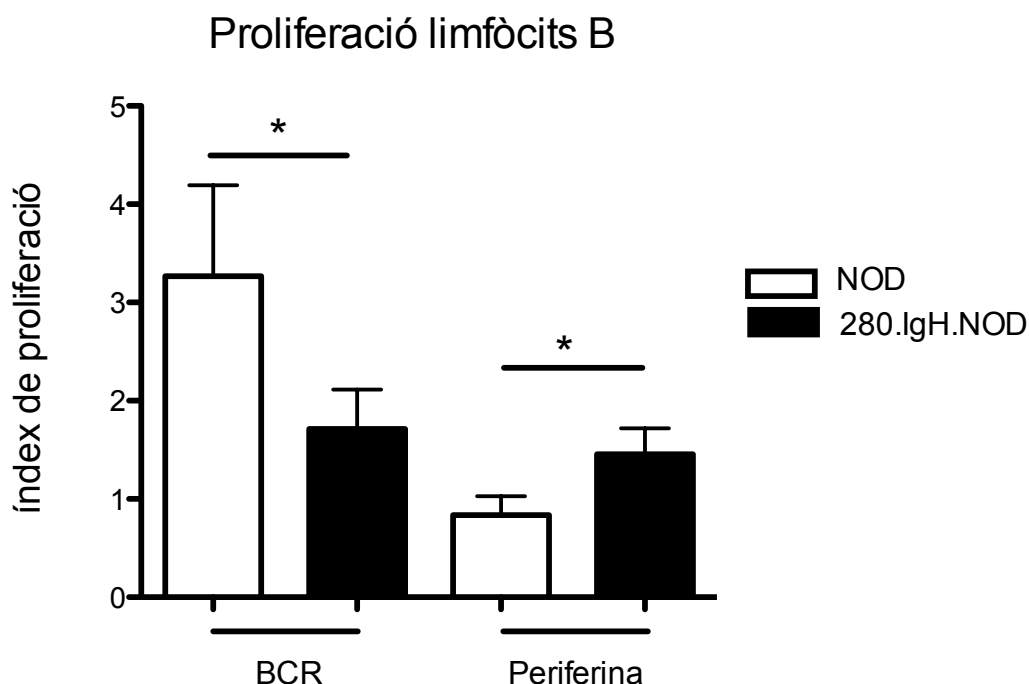
A la literatura s'ha descrit que els limfòcits T tenen la capacitat de rescatar els limfòcits B de l'estat anèrgic<sup>215</sup>, de manera que, en presència de limfòcits T, els limfòcits B anèrgics poden proliferar. És per això que es va decidir realitzar la proliferació dels limfòcits B cocultivats amb els limfòcits T.

En aquests assajos de proliferació es va utilitzar la periferina i l'anti-BCR com estímuls. L'estímul anti-BCR va ser dil·luït en el medi, com s'havia realitzat anteriorment, en canvi, i com a conseqüència de la insolubilitat de la periferina, aquesta va ser anclada a la placa de cultiu abans de sembrar-hi les cèl·lules.

Els resultats obtinguts van mostrar que els limfòcits B procedents de la soca NOD proliferaven més que els limfòcits B procedents de la soca transgènica quan estaven en contacte amb l'estímul BCR. Aquests resultats són semblants als resultats obtinguts en les proliferacions de limfòcits B, sols, és a dir quan aquests eren estimulats després de la selecció negativa. En aquest cas, igual que en l'anterior, s'observa una diferència estadísticament significativa ( $p$ -value= 0,034) (Figura 50).

En canvi, respecte a la proliferació dels limfòcits B que entren en contacte amb la periferina, s'observa una tendència inversa. Els limfòcits B procedents de la soca transgènica proliferen més que els procedents de la soca NOD, on no s'observa pràcticament proliferació (índex de proliferació situat entorn d'1). La diferència entre ambdues soques és estadísticament significativa ( $p$ -value= 0,0389).

A la vista dels resultats és interessant ressaltar el fet que els limfòcits B procedents de la soca 280.IgH.NOD proliferen de manera semblant quan reben un estímul a través del seu BCR, i quan entren en contacte amb la periferina. En canvi, això no passa en els limfòcits B procedents de la soca NOD. Aquests resultats corroboren, una vegada més, l'especificitat contra la periferina del BCR transgènic expressat a la superfície dels limfòcits B de la soca 280.IgH.NOD.



**Figura 50.-** Proliferació dels limfòcits B després de l'estimulació amb els estímuls anti-BCR i periferina. Les proliferacions van ser considerades en funció de la relació entre els limfòcits B presents en els pous control i els que contenien un dels estímuls. Estudi realitzat en limfòcits B procedents de femelles 280.IgH.NOD i germans de camada no transgènics de 12 setmanes d'edat (en l'estímul a través de BCR dues repeticions i sis animals per grup. En el cultiu amb periferina tres repeticions i tres animals per grup).

#### 10.4. Estudi de les subpoblacions de limfòcits B després de la proliferació

A continuació es va aprofundir en la caracterització dels limfòcits B. Es va estudiar si les subpoblacions de limfòcits proliferaven per igual sota els diferents estímuls o si una d'elles proliferava més respecte a l'altra. Concretament, es van estudiar les diferències entre les subpoblacions de limfòcits marginals i fol·liculars, ja que s'havien observat diferències en aquestes poblacions entre la soca NOD i la soca transgènica en estat basal.

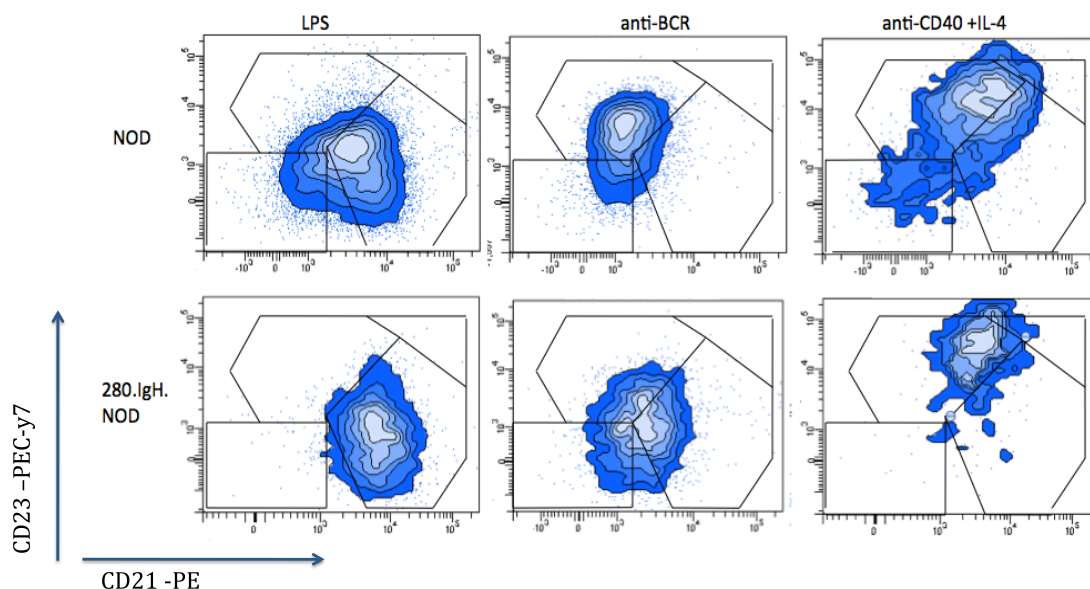
Per realitzar aquests estudis, es van sembrar les cèl·lules juntament els diferents estímuls abans utilitzats (LPS, BCR, CD40+IL-4) durant 72 hores. Passat aquest temps es van analitzar les cèl·lules per citometria de flux utilitzant els marcadors CD21 i CD23, que permeten diferenciar les subpoblacions de limfòcits B entre fol·liculars i marginals (Figura 51).

Els resultats observats van mostrar que no hi havia pràcticament diferències entre els limfòcits procedents de la soca transgènica respecte als procedents de la soca NOD, sinó que les poblacions limfocitàries canviaven en funció de l'estímul al qual estaven sotmeses de manera semblant en ambdós grups d'animals. A la figura 49 s'observa el marcatge pels marcadors CD21 i CD23 en cada un de les condicions de cultiu.

Després de cultivar els limfòcits B durant 72 hores amb l'estímul LPS, els limfòcits B presentaven un fenotip semblant al de les cèl·lules marginals. La majoria dels limfòcits presenten el marcador CD21 a la seva superfície i nivells baixos de CD23.

Respecte als limfòcits cultivats amb l'estímul anti-BCR, és on es van observar més variacions entre una i altra soca. Els limfòcits B de la soca NOD adoptaven un fenotip semblant a les cèl·lules fol·liculars, amb nivells alts de CD23 i intermitjos de CD21. En canvi, els limfòcits B procedents de la soca 280.IgH.NOD adoptaven un fenotip no tant definit, amb valors intermitjos pels marcadors CD21 i CD23.

Finalment, quan es va observar els limfòcits B que havien estat cultivats amb l'estímul anti-CD40 i IL-4, es va veure que expressaven a nivells molt alts d'ambdós marcadors, tant el marcador CD23 com el CD21, un marcatge molt semblant als limfòcits fol·liculars. Tot i que la majoria presenten un fenotip semblant al de les cèl·lules fol·liculars, alguns dels limfòcits B presentarien un fenotip semblant al de les cèl·lules transicionals de tipus 2.



**Figura 51.-** Imatges representatives de les poblacions de limfòcits B de la soca NOD i 280.IgH.NOD després d'haver estat cultivades 72 hores amb els diferents estímuls (LPS, anti-BCR i anti-CD40 +IL-4). Estudis realitzats amb 3 repeticions de 3 femelles per grup.

## 11.- Anàlisi de l'infiltrat leucocitari present als illots pancreàtics

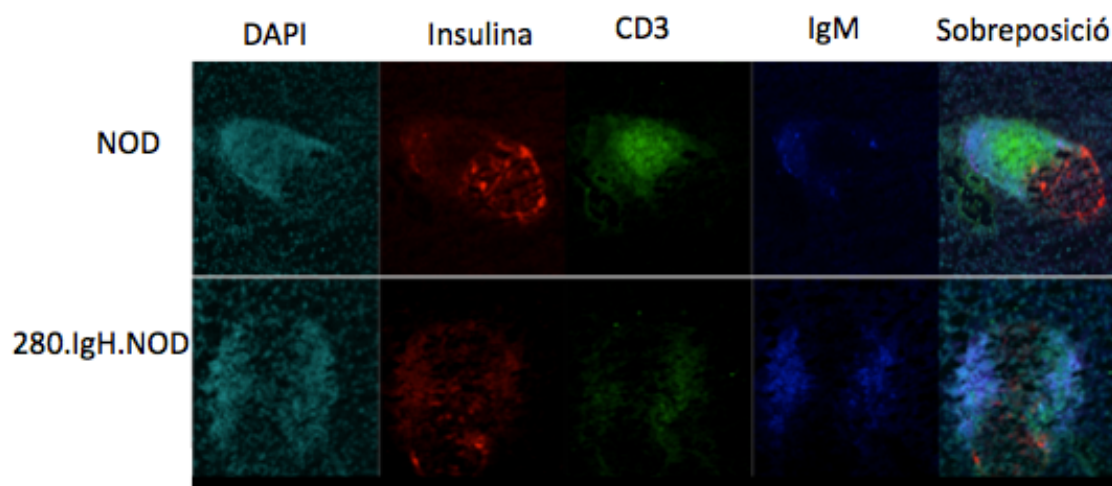
Per conèixer més a fons el paper que duen a terme els limfòcits B en el decurs de la diabetis es van analitzar els limfòcits procedents de l'infiltrat leucocitari als illots pancreàtics. Es van fer estudis de distribució dels limfòcits a l'infiltrat mitjançant tincions d'immunofluorescència en crioseccions de 8µm de pàncrees. També es van estudiar la població de limfòcits infiltrants als illots obtinguts mitjançant digestions enzimàtiques del pàncrees i posteriorment analitzats per citometria de flux.

### **11.1. Distribució dels limfòcits T i B en l'infiltrat dels illots pancreàtics**

Per analitzar la distribució dels limfòcits T i B infiltrants en els illots pancreàtics, es va realitzar una tinció histològica sobre el pàncrees utilitzant anticossos per marcar específicament els limfòcits B i T. També es va utilitzar un anticòs que reconeixia la insulina per poder localitzar millor els illots.

Les tincions histològiques van mostrar que l'infiltrat leucocitari dels ratolins de la soca NOD presentaven zones T i zones B molt delimitades, en canvi, l'infiltrat leucocitari dels ratolins de la soca 280.IgH.NOD presentaven una infiltració menys compartimentalitzada, on no es podien discriminar les regions de l'illot predominantment infiltrades per poblacions de limfòcits T i B (Figura 52). Aquest fet apunta cap a l'existència d'una major interacció entre limfòcits B i T en la soca transgènica. En la tinció nuclear amb DAPI s'observa el cúmul de limfòcits infiltrants, que coincideix amb la zona amb major densitat nuclear.





**Figura 52.-** Tinció sobre pàncrees de ratolins de la soca NOD i 280.IgH.NOD. S'han utilitzat pàncrees de ratolins femelles de 9 setmanes d'edat que s'han marcat els limfòcits B (blau), els limfòcits T (verd) i la insulina (vermell). Imatges preses a 30 augments.

## 11.2. Relació entre els limfòcits T i B en l'infiltrat

Després d'observar diferències en la distribució de l'infiltrat leucocitari entre la soca 280.IgH.NOD respecte a la soca NOD, es va analitzar per citometria si hi havia diferències en la proporció de limfòcits T i B que colonitzaven els illots pancreàtics.

Els resultats van mostrar que tot i que es distribuïen de forma diferent en l'infiltrat la proporció de les dues poblacions limfocitàries era similar en ambdues soques (Figura 53).

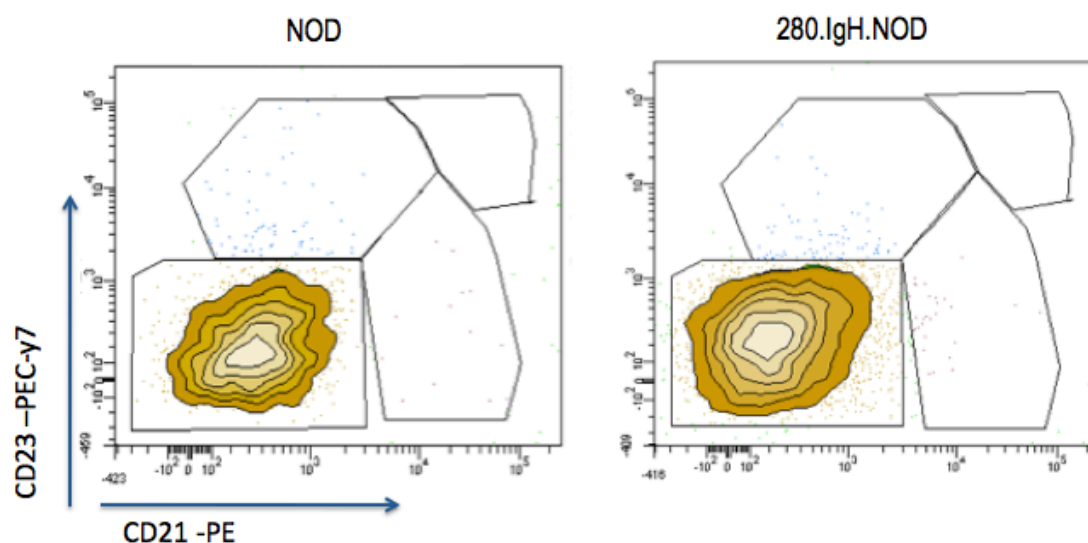


**Figura 53.-** Relació de limfòcits T respecte dels limfòcits B que es troben infiltrant els illots. S'han utilitzat 5 femelles de 10 setmanes d'edat per a cada una de les soques.

### 11.3. Caracterització dels limfòcits B infiltrants als illots

Per tal de conèixer més a fons l'origen i les característiques dels limfòcits B infiltrants als illots, es va realitzar un immunofenotipatge mitjançant citometria de flux. Es van marcar els limfòcits B procedents de l'infiltrat leucocitari als illots pancreàtics amb anticossos que reconeixien els marcadors de superfície, els mateixos que s'utilitzen per caracteritzar les subpoblacions de limfòcits B de la melsa.

Els resultats d'aquesta caracterització van mostrar que en les dues soques de ratolí, 280.IgH.NOD i NOD, els limfòcits B que es trobaven infiltrant els illots pancreàtics tenien un fenotip de cèl·lules transicionals de tipus 1, o semblant (Figura 54). No obstant això, els nivells d'expressió de les immunoglobulines M i D era diferent en les dues soques. Aquests resultats es mostren i comenten més endavant, on es comparen les expressions d'aquestes molècules dels limfòcits procedents de la melsa amb els limfòcits B procedents dels illots.



**Figura 54.-** Imatges representatives dels resultats de les citometries de flux realitzades en limfòcits B infiltrants als illots en la soca NOD i 280.IgH.NOD. S'observa que els limfòcits infiltrants presenten un fenotip semblant a les cèl·lules transicionals de tipus 1.

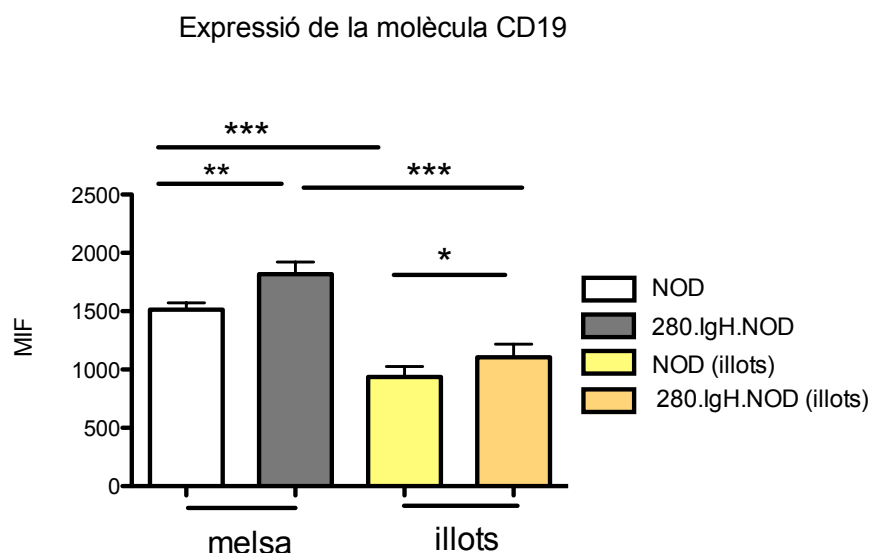
## 12.- Diferències fenotípiques entre els limfòcits B de melsa i els limfòcits B que infiltren els illots pancreàtics

### **12.1. Expressió de la molècula CD19**

Per analitzar l'expressió de la molècula CD19 es van seleccionar els limfòcits CD19 positius i es va estudiar la MIF que emetia el fluorocrom unit a l'anticòs que es va utilitzar per seleccionar les cèl·lules. L'expressió de la molècula CD19 està relacionada amb l'activació dels limfòcits B, per tant, es va creure que era important analitzar possibles diferències d'activació entre els limfòcits procedents de la soca transgènica i els limfòcits B procedents de la soca NOD.

Els resultats obtinguts van mostrar un augment significatiu en l'expressió de CD19 en els limfòcits B procedents dels illots en la soca transgènica ( $p\text{-value}=0.015$ ). Quan es comparen els nivells d'expressió de CD19 en els limfòcits B de melsa respecte dels limfòcits B procedents de l'infiltrat, s'observa que, en les dues soques, els limfòcits procedents dels illots presenten una menor expressió de CD19 (NOD  $p\text{-value}<0.0001$ , 280.IgH.NOD  $p\text{-value}=0.0002$ )(Figura 55).

En conclusió, aquests resultats suggeririen que els limfòcits B procedents de la soca transgènica estarien més activats que els procedents de la soca NOD. No obstant això, en ambdues soques els limfòcits procedents de la melsa estarien més activats en comparació als limfòcits B procedents dels illots.



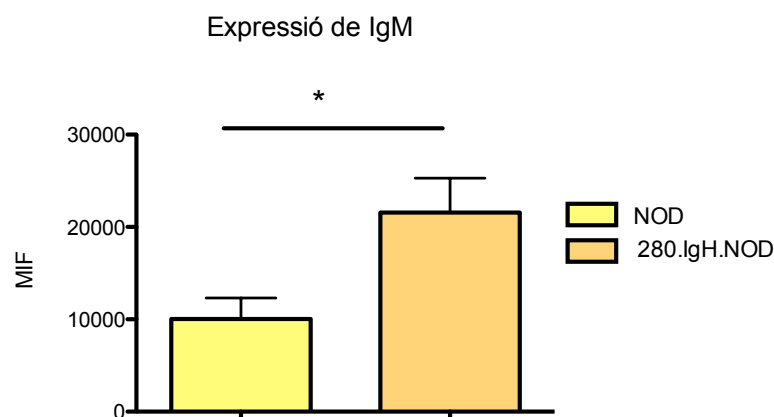
**Figura 55.-** Expressió de la molècula de CD19 en funció de la mediana d'intensitat de fluorescència en limfòcits B procedents de melsa i de l'infiltrat leucocitari als illots. Estudi realitzat amb 10 femelles per grup.

## 12.2. Expressió de la IgM

Es va estudiar més a fons l'expressió de les immunoglobulines de superfície. Concretament, es van estudiar els nivells d'immunoglobulina M que es trobaven a la membrana dels limfòcits B, ja que aquesta molècula està estretament relacionada amb l'activació i homeòstasi dels limfòcits B.

Per tal de realitzar aquest estudi, es van comparar els nivells d'expressió de la IgM dels limfòcits B infiltrants a illots de la soca 280.IgH.NOD i la soca NOD.

Els resultats van mostrar un increment en l'expressió de la molècula IgM en la superfície dels limfòcits B infiltrants als illots de la soca 280.IgH.NOD respecte els procedents de la soca NOD ( $p\text{-value}=0.0175$ ) (Figura 56).

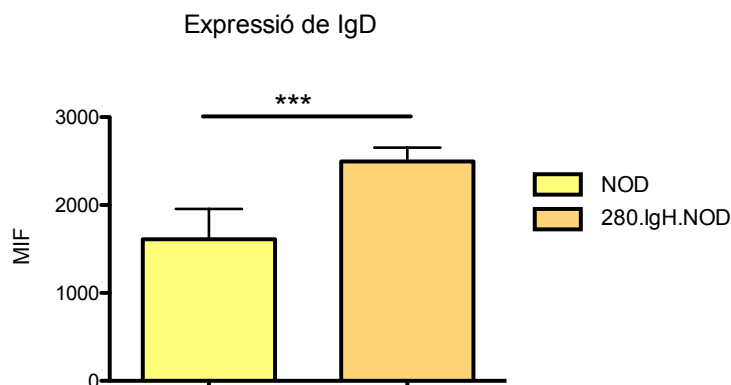


**Figura 56.-** Expressió de la molècula de IgM en funció de la mediana d'intensitat de fluorescència en limfòcits B procedents de melsa i de l'infiltrat leucocitari als illots. Estudi realitzat amb 10 animals per grup de 12 setmanes d'edat.

## 12.3 Expressió de la IgD

També es van analitzar els nivells d'expressió de la immunoglobulina D presents a la membrana dels limfòcits B que es troben infiltrant als illots pancreàtics.

Els resultats van mostrar un increment de l'expressió de la immunoglobulina D en els limfòcits B procedents de l'infiltrat leucocitari dels illots de la soca 280.IgH.NOD en comparació els de la soca NOD ( $p\text{-value}=0.0002$ ) (Figura 57). És interessant destacar que aquesta tendència és inversa quan s'analitza els nivells d'expressió de IgD en els limfòcits procedents de la melsa.



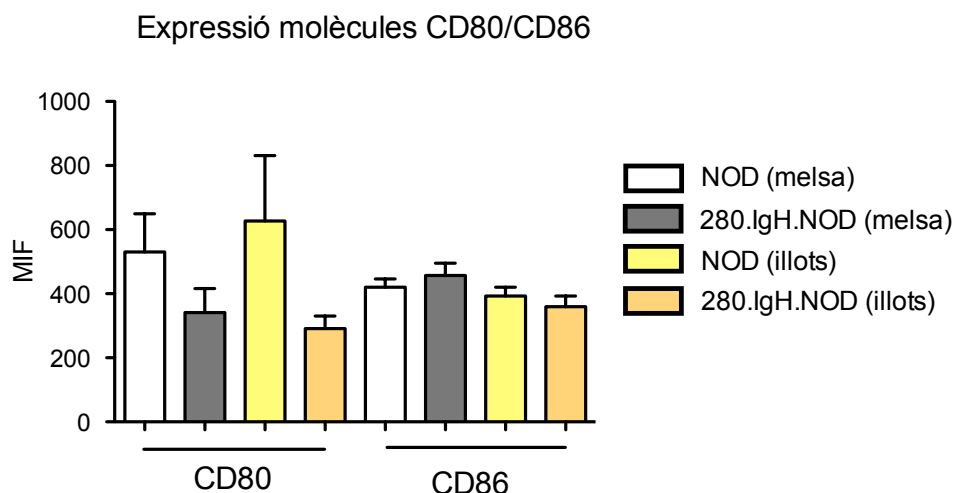
**Figura 57.-** Expressió de la molècula de IgD en funció de la mediana d'intensitat de fluorescència en limfòcits B procedents de melsa i d'infiltrat leucocitari als illots. Estudi realitzat amb 10 femelles per grup a les 12 setmanes d'edat.

#### 12.4. Expressió de molècules coestimuladores CD80 i CD86

Per analitzar el paper dels limfòcits B com a cèl·lules presentadores d'antígen es va estudiar l'expressió de les molècules B7 a la superfície cel·lular, i es va comparar l'expressió d'aquestes molècules en els limfòcits B presents a la melsa i els presents en l'infiltrat leucocitari a illot, en les dues soques de ratolí.

L'expressió de les molècules B7 (CD80 i CD86) es va analitzar seleccionant els limfòcits CD19 positius, i es va estudiar la MIF que emetia el fluorocrom unit a l'anticòs que reconeixia cada una de les molècules. Aquestes molècules són necessàries per a què els limfòcits B a portin a terme l'activació dels limfòcits T.

Els resultats obtinguts van mostrar una expressió molt semblant d'aquestes molècules en ambdues soques estudiades i tampoc s'apreciaven diferències d'expressió entre els limfòcits B procedents de melsa i els limfòcits procedents de l'infiltrat leucocitari als illots pancreàtics (Figura 58).



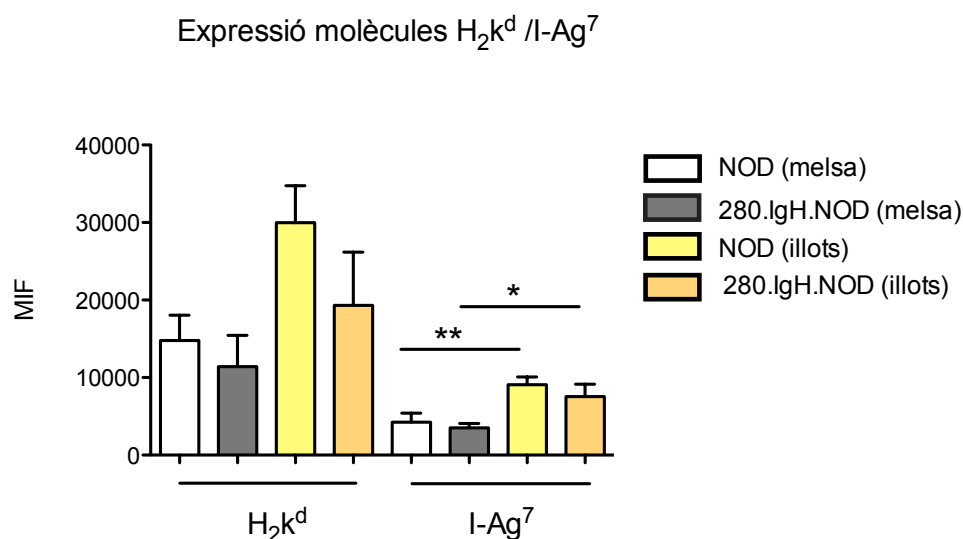
**Figura 58.-** Expressió de la molècula de CD80 i CD86 en funció de la mediana d'intensitat de fluorescència en limfòcits B procedents de melsa i d'infiltrat leucocitari als illots. Estudi realitzat amb 10 femelles per grup a les 12 setmanes d'edat.

## 12.5. Expressió de molècules MHC I/ II

Es va aprofundir en l'estudi del paper dels limfòcits B com a cèl·lules presentadores d'antigen, per això es va analitzar l'expressió de les molècules de MHC de classe I i classe II de la superfície cel·lular dels limfòcits B. És a través d'aquestes molècules que els limfòcits B, i la resta de cèl·lules presentadores d'antigen, presenten els antígens als limfòcits T.

Per analitzar l'expressió de les molècules MHC I ( $H_2K^d$ ) i MHC II ( $IA-g^7$ ) es van seleccionar els limfòcits CD19 positius i es va estudiar la mediana d'intensitat de fluorescència (MIF) que emetia el fluorocrom unit a l'anticòs que reconeixia de forma específica les diferents molècules.

Els resultats obtinguts van mostrar valors d'expressió de la molècula  $H_2K^d$  molt semblants en les dues soques. També es va observar valors semblants pel que fa l'expressió de la molècula  $IA-g^7$  en les dues soques. Amb tot, s'observa una tendència, encara que no estadísticament significativa, en els nivells d'expressió més baixos en ambdues molècules en ratolins de la soca 280.IgH.NOD. En les dues soques s'observa una major expressió de la molècula  $IA-g^7$  a nivell dels limfòcits procedents dels illots pancreàtics en comparació als limfòcits procedents de melsa (NOD  $p$ -value=0,005, 280.IgH.NOD  $p$ -value=0,022) (Figura 59).



**Figura 59.-** Expressió de la molècula de  $H_2K^d$  i I-Ag<sup>7</sup> en funció de la mediana d'intensitat de fluorescència en limfòcits B procedents de melsa i d'infiltrat leucocitari als illots. Estudi realitzat amb 10 femelles per grup a les 12 setmanes.

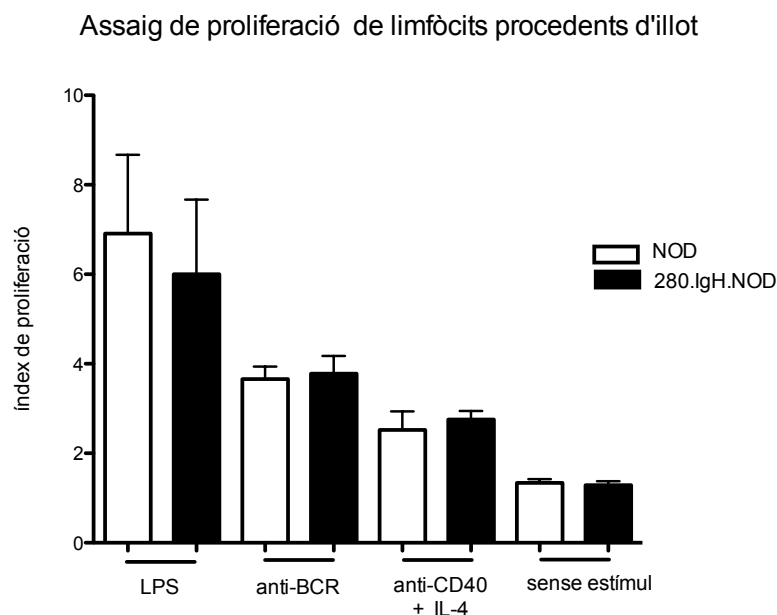
### 13.- Estudis *in vitro* de limfòcits B procedents d'illot

#### **13.1. Proliferació dels limfòcits procedents d'illot.**

Un cop realitzats els estudis funcionals *in vitro* dels limfòcits B de procedents de melsa, es van realitzar estudis funcionals *in vitro* amb limfòcits B que es trobaven infiltrant als illots pancreàtics. Es van realitzar estudis de proliferació utilitzant els mateixos estímuls que s'havien utilitzat en els estudis de proliferació dels limfòcits B procedents de melsa (LPS, anti-BCR i anti-CD40 més IL-4).

Es van recollir els limfòcits infiltrants i es van cultivar amb els diferents estímuls durant 72 hores. Per tal d'analitzar la proliferació cel·lular, es van marcar els limfòcits amb CFSE. Aquest producte penetra al citoplasma i es va perdent a mesura que es divideixen les cèl·lules. Mitjançant l'ús del programa modfit, es va realitzar el càlcul de les diferents divisions cel·lulars i es va establir l'índex de proliferació dels limfòcits B en les diferents condicions.

Els resultats obtinguts no van mostrar diferències en la proliferació dels limfòcits transgènics procedents de l'infiltrat leucocitari als illots pancreàtics respecte als de la soca NOD. Aquests resultats contrasten amb els resultats de proliferació obtinguts amb els limfòcits procedents de melsa, on s'observaven diferències proliferatives en totes les condicions (Figura 60).



**Figura 60.-** Proliferació dels limfòcits B després de l'estimulació amb diferents estímuls. Les proliferacions van ser considerades en funció de l'índex de proliferació resultant de les divisions observades en la tinció de CFSE. Estudi realitzat amb ratolins 280.IgH.NOD i germans de camada no transgènics de 12 setmanes d'edat (5 repeticions per estímul).

### 13.2. Estudi de les subpoblacions de limfòcits B infiltrants als illots pancreàtics després de la proliferació.

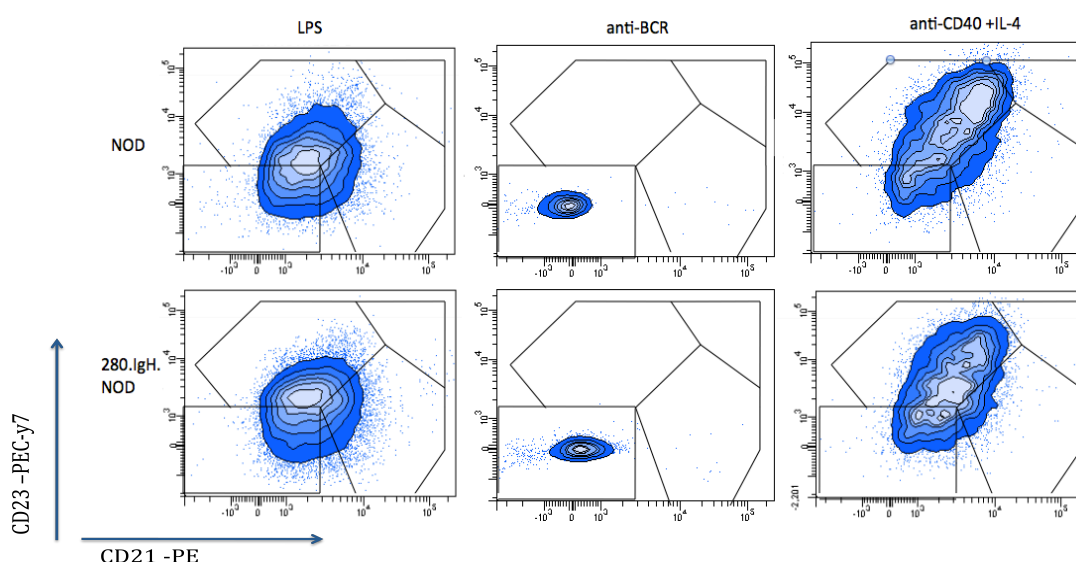
Igual com s'havia realitzat en les proliferacions de limfòcits procedents de melsa, es va estudiar quina sub població de limfòcits B proliferava i/o adoptaven quan es cultivaven amb els diferents estímuls. Ens interessava saber quin fenotip adoptaven després d'haver estat cultivats amb l'estímul, ja que els limfòcits B infiltrants als illots pancreàtics just després d'aïllar-los presenten un fenotip similar a la dels limfòcits B transicionals de tipus 1. Tant en ratolins NOD com en ratolins 280.IgH.NOD. A més, els limfòcits B infiltrants de les dues soques presenten un perfil de proliferacions molt semblant, quan són cultivats amb diferents estímuls, a diferència del que s'observa en els limfòcits B procedents de melsa.

En els resultats obtinguts s'observa que a dels limfòcits B procedents de melsa que adopten un fenotip clarament marginal quan estan estimulats amb LPS, els limfòcits pocedents de l'infiltrat leucocitari als illots adopten un fenotip intermig, no gaire definit, amb nivells intermitjos d'expressió de CD21 i CD23 que es situa en la zona que delimita els fenotips fol·liculars, marginals i transicionals de tipus 1 (Figura 61).



Respecte al fenotip adoptat pels limfòcits B infiltrants després d'haver estat estimulats a través del BCR, aquest és completament diferent del que s'havia observat en els limfòcits B de melsa cultivats amb el mateix estímul. Per una banda, els limfòcits B procedents de l'infiltrat leucocitari als illots presenten un fenotip semblant al de les cèl·lules transicionals de tipus 1, el mateix que presenten els limfòcits B infiltrant en estat basal. Per altra banda, els limfòcits B procedents de melsa, quan són estimulats a través del seu BCR, adopten un fenotip semblant a les cèl·lules fol·liculars. Tant els limfòcits B procedents de la soca transgènica, 280.IgH.NOD, com els limfòcits B procedents de la soca NOD.

Finalment, quan es van observar els limfòcits B que havien estat cultivats amb l'estímul anti-CD40 i IL-4, es va veure que expressaven nivells molt alts d'ambdós marcadors, tant el marcador CD23 com el CD21, un marcatge que situa la població limfocitària en un fenotip semblant al de les cèl·lules fol·liculars.



**Figura 61.-** Imatges representatives dels limfòcits B infiltrants als illots pancreàtics de la soca NOD i 280.IgH.NOD després d'haver estat cultivats 72 hores amb diferents estímuls (LPS, anti-BCR i anti-CD40 +IL-4). Estudis realitzats amb 3 repeticions de 3 femelles per grup.

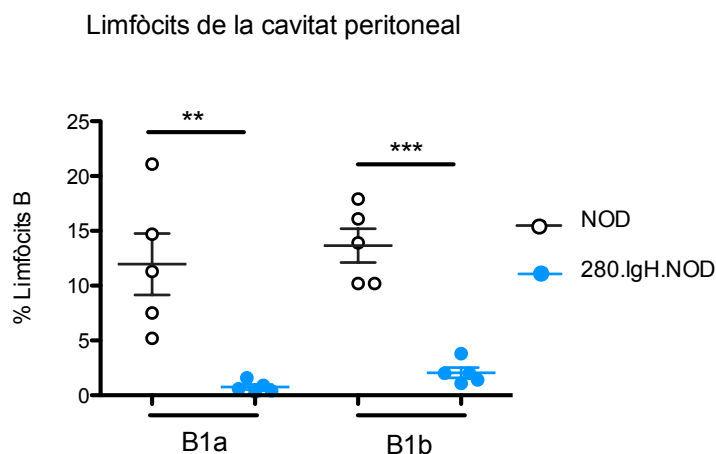
## 14.- Estudi dels limfòcits B de la cavitat peritoneal

### 14.1. Estudi de les poblacions B1a i B1b de la cavitat peritoneal

En els ratolins NOD s'ha descrit un increment de limfòcits B anti-periferina a la cavitat peritoneal, respecte altres soques de ratolí<sup>216</sup>. És per això que es va estudiar les subpoblacions de limfòcits B de la cavitat peritoneal en la soca 280.IgH.NOD en comparació la soca NOD.

Les subpoblacions de limfòcits B1 en la cavitat peritoneal es van analitzar mitjançant citometria de flux, utilitzant els mateixos criteris utilitzats per estudiar aquestes poblacions en la melsa. Expressió de CD43, IgM i CD5 per diferenciar entre B1a i B1b. Els estudis es van dur a terme a les 12 setmanes d'edat.

Els resultats van mostrar que en els ratolins transgènics les poblacions B1, tant B1a com B1b, es trobaven disminuïdes comparades amb les poblacions B1 dels seus germans de camada no transgènics (Figura 62). En els animals NOD la població de cèl·lules B1 presents a la cavitat peritoneal representaven entorn del 30% dels limfòcits B, en canvi, en els animals portadors del transgen aquesta població no arribava a representar el 5%. La diferència entre les poblacions és estadísticament significativa, tant per la subpoblació B1a ( $p$ -value=0,004), com per la població B1b ( $p$ -value<0,001).



**Figura 62.-** Percentatge de limfòcits B1a i B1b peritoneals a les 12 setmanes d'edat. Els limfòcits de ratolí NOD estan representats en blanc i els del ratolí 280.IgH.NOD en blau. S'observa una disminució de les dues poblacions en la soca 280.IgH.NOD respecte als seus germans de camada no transgènics NOD. Cada grup inclou la mitjana (amb desviació estàndard) de les dades procedents de 5 femelles.

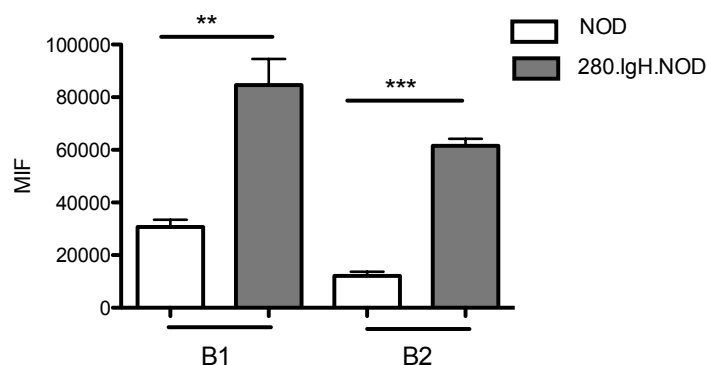
## 14.2. Estudi de l'expressió de IgM dels limfòcits B presents a la cavitat peritoneal

Després d'observar les diferències en les poblacions de limfòcits B localitzats a la cavitat peritoneal es van passar a analitzar els nivells d'expressió d'immunoglobulina M. Aquests estudis es van dur a terme, ja que s'ha descrit el paper rellevant de les immunoglobulines en el procés d'endocitosis d'antígens. Per tant, es va creure interessant analitzar si hi havia diferències en l'expressió de les immunoglobulines de membrana.

Els resultats van mostrar un augment significatiu d'expressió de la IgM en les poblacions de limfòcits B presents a la cavitat peritoneal, tant en les poblacions de limfòcits B1 com els B2 en ratolins 280.IgH.NOD comparat amb els seus germans de camada no transgènics (Figura 63). Les diferències observades tenien significança estadística (població B1  $p$ -value= 0,0065, població B2  $p$ -value<0.0001).

Aquests resultats apuntarien que els limfòcits B de la cavitat peritoneal procedents de la soca transgènica estarien més activats i/o podrien tenir una major capacitat d'endocitar antígens presents en aquest compartiment que els seus homòlegs no transgènics.

Expressió de IgM en els limfòcits B de la cavitat peritoneal

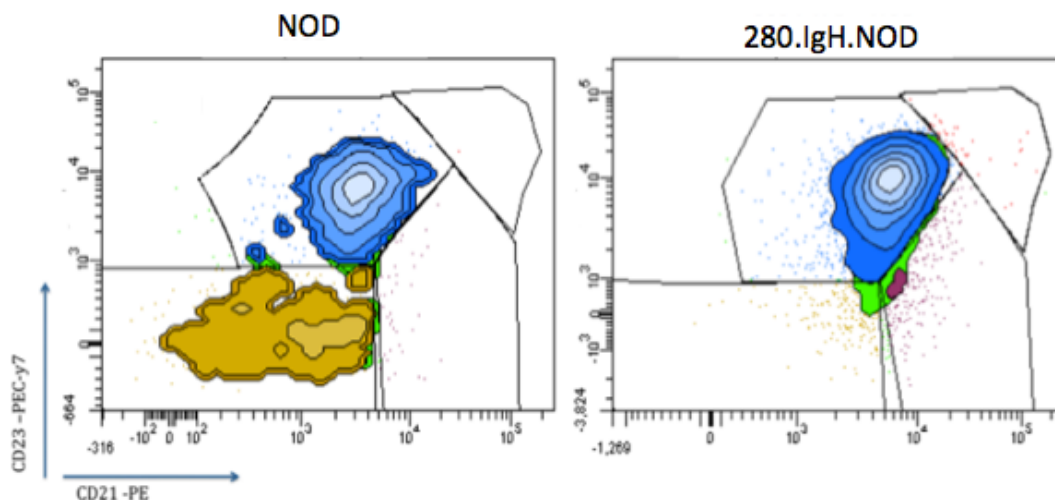


**Figura 63 .-**Representació de l'expressió de IgM en els limfòcits B1 i B2 a la cavitat peritoneal a les 12 setmanes d'edat. S'observa un augment de l'expressió de la IgM de les dues poblacions en la soca 280.IgH.NOD respecte als seus germans de camada no transgènics. Cada grup representa la mitjana (amb desviació estàndard) de les dades procedents 3 animals.

### 14.3. Caracterització fenotípica dels limfòcits B presents a la cavitat peritoneal

Després d'analitzar les poblacions de limfòcits B de la cavitat peritoneal i observades diferències tan rellevants en l'expressió de IgM, es va aprofundir en la caracterització de les cèl·lules B2 que eren presents en la cavitat peritoneal, i suposaven la majoria de la població en els animals transgènics. Per tal de caracteritzar-les millor, es van estudiar mitjançant citometria de flux utilitzant els marcadors per caracteritzar les subpoblacions de limfòcits B de melsa (CD21 i CD23).

En els animals NOD, es va observar que hi havia dues poblacions diferenciades. Una població amb fenotip semblant a les foliculars que suposava entorn del 50%, i una altra població formada per cèl·lules que presentaven un fenotip semblant a les cèl·lules transicionals de tipus 1. En canvi, en els limfòcits B procedents de la soca 280.IgH.NOD presents a la cavitat peritoneal presentaven una única població amb un fenotip semblant al de les cèl·lules foliculars, com es visualitza en la següent imatge (Figura 64).



**Figura 64.-** Imatges representatives del resultat de les citometries de flux realitzades en limfòcits B infiltrants presents a la cavitat peritoneal en la soca NOD i 280.IgH.NOD (3 repeticions per soca). S'observa que els limfòcits procedents de la soca NOD presenten dues poblacions, una amb característiques foliculars i l'altra amb característiques semblants a les transicionals de tipus 1. En canvi els limfòcits transgènics de la cavitat peritoneal només presenten un fenotip semblant a les cèl·lules foliculars.

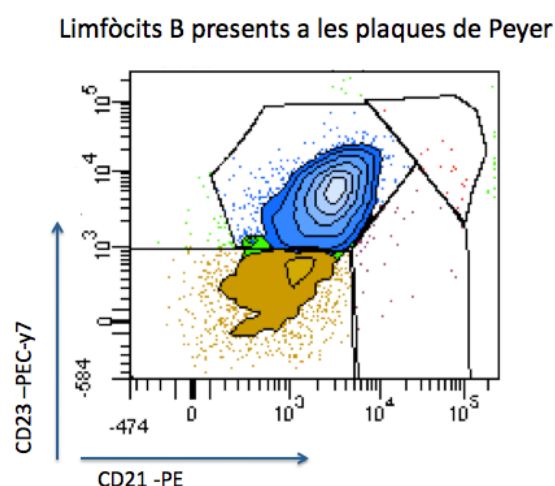
## 15.- Estudi dels limfòcits B presents a les plaques de Peyer

### **15.1. Caracterització dels limfòcits B presents a les plaques de Peyer**

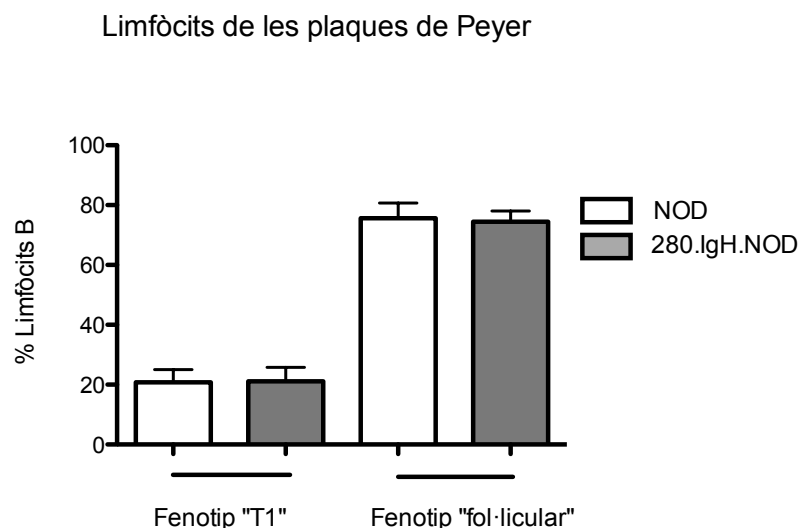
Després d'observar diferències poblacionals entre els limfòcits B presents a la cavitat peritoneal de la soca NOD i la soca transgènica, es va estudiar les poblacions de limfòcits B en altres òrgans secundaris. Concretament, es va analitzar la presència dels limfòcits B en les plaques de Peyer. Per tal de caracteritzar els limfòcits B presents a les plaques de Peyer es van utilitzar els marcadors de CD21 i CD23.

Mitjançant l'ús dels marcadors de superfície, es va observar que a les plaques de Peyer es distingeixen dos tipus de poblacions, una semblant a les cèl·lules fol·liculars, amb presència dels marcadors CD21 i CD23 a la seva superfície, i una altra amb un fenotip semblant a les transicionals de tipus 1 (T1), sense presència dels marcadors CD21 i CD23 a la superfície. Aquestes dues poblacions s'observen a la imatge obtinguda per citometria de flux (Figura 65).

Els resultats de l'estudi dels limfòcits B a plaques de Peyer van mostrar uns valors semblants d'aquestes dues poblacions en les dues soques. La població de cèl·lules amb fenotip semblant al de les cèl·lules fol·liculars se situa entorn del 80% del total. La resta de limfòcits B que conformen les plaques de Peyer, amb un fenotip semblant al dels limfòcits B transicionals de tipus 1, suposa el 20% restant en ambdues soques (Figura 66).



**Figura 65.-** Imatge representativa de la citometria realitzada en els limfòcits B presents a les plaques de Peyer.



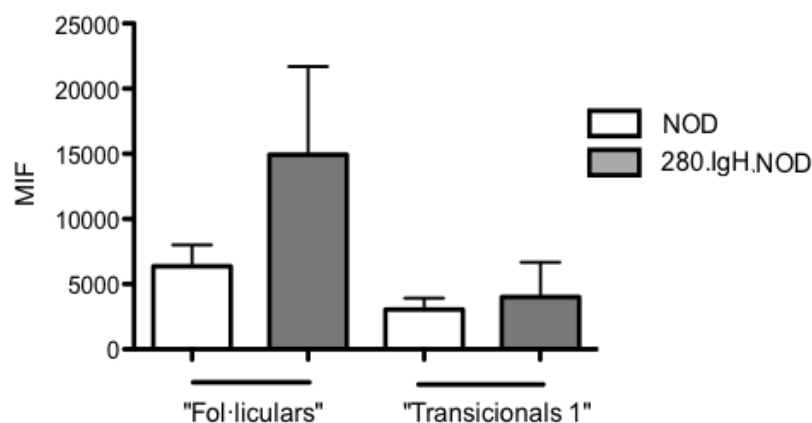
**Figura 66.-** Percentatge de les poblacions de limfòcits B identificades a les plaques de Peyer de la soca NOD i la soca 280.IgH.NOD. Estudi realitzat amb 3-5 femelles de 12 setmanes d'edat.

## 15.2. Estudi d'expressió de IgM en els limfòcits B presents a les plaques de Peyer

Per aprofundir en l'estudi dels limfòcits B presents a les plaques de Peyer es va estudiar l'expressió de la IgM d'aquests.

Els resultats van mostra que els limfòcits B procedents de la soca transgènica presentaven un lleuger augment de l'expressió de IgM, no obstant això, la diferència és només una tendència sense significança estadística (Figura 67).

## Expressió IgM en limfòcits B presents a les plaques de Peyer



**Figura 67.-** Representació de l'expressió de IgM en les poblacions limfocitàries presents a les plaques de Peyer a les 12 setmanes d'edat de les soques NOD i 280.IgH.NOD. Estudi realitzat amb 3-5 femelles.

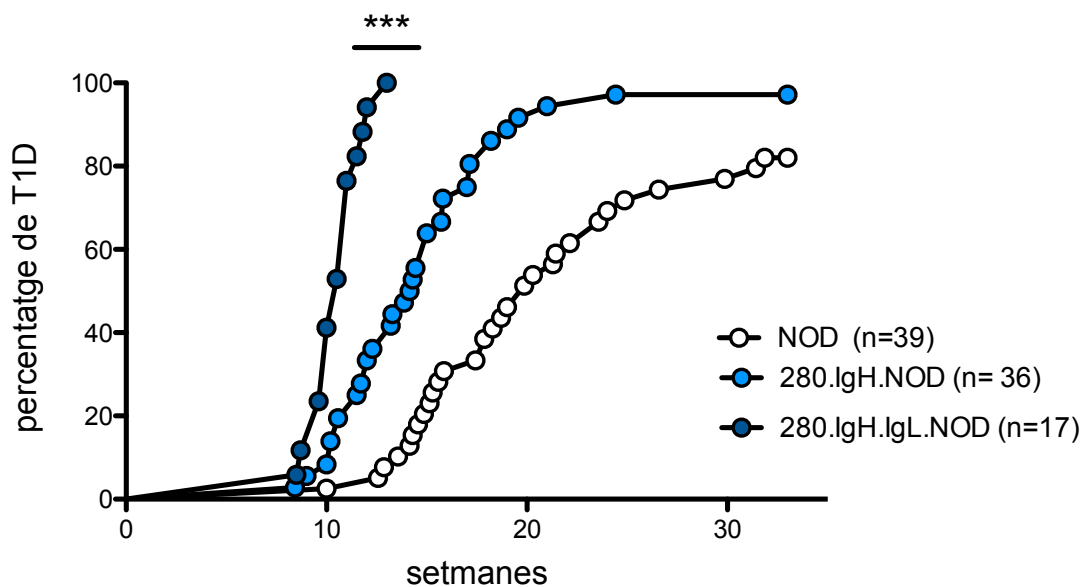
## 16.- Incidència de la soca 280.IgH.IgL.NOD

Després de realitzar els estudis del desenvolupament de la malaltia i els estudis fentotípics i funcionals dels limfòcits B dels ratolins 280.IgH.NOD vam estudiar la incidència de la diabetis en la soca 280.IgH.IgL.NOD, que combina la cadena lleugera i la cadena pesada del BCR dels gens de les immunoglobulines de l'hibridoma H280, i a on totes les immunoglobulines produïdes reconeixien la periferina. Per tant, podem considerar aquests ratolins són monoclonals pel que fa l'especificitat antigènica dels seus limfòcits B.

Els resultats van mostrar que els animals de la soca 280.IgH.IgL.NOD tenen un debut de la malaltia a una edat més jove en comparació els ratolins de la soca NOD i els de la soca 280.IgH.NOD. A més, la incidència final de la diabetis és superior a la soca NOD i a la soca 280.IgH.NOD. És a dir, ratolins 280.IgH.IgL.NOD presenten una forma molt més accelerada de la malaltia en comparació els seus germans no transgènics i en comparació als animals que expressen només la cadena pesada transgènica del BCR. Com s'observa a la figura 65 en la soca 280.IgH.IgL.NOD tots els animals estudiats van debutar en la malaltia abans de les 15 setmanes, assolint una incidència final del 100%. Comparant les corbes d'incidència de la malaltia de les diferents soques, s'observa una diferència estadísticament significativa ( $p\text{-value} < 0.0001$  respecte de la soca NOD i de la soca 280.IgH.NOD) en l'aparició de la T1D. Aquests resultats evidencien una acceleració dramàtica de la malaltia en els ratolins 280.IgH.IgL.NOD (Figura 68).

Aquest fet posa al descobert que els limfòcits B els qual el seu BCR reconeix la periferina tenen un paper rellevant en el desenvolupament de la malaltia. A més, són capaços d'accelerar la malaltia i augmentar la incidència d'aquesta quan s'expressa aquest BCR de manera transgènica a la seva superfície cel·lular.

### Incidència en femelles



**Figura 68.-** Incidència de la T1D en femelles. Es mostren els percentatges d'incidència de la malaltia en cada una de les tres soques de ratolins estudiades.



## 17.- Estudi de les subpoblacions de limfòcits B melsa de ratolí en la soca 280.IgH.IgL.NOD

Per aprofundir més en el paper dels limfòcits B anti-periferina en el desenvolupament de la malaltia, es van realitzar estudis fenotípics de les diferents subpoblacions de limfòcits B presents a la melsa dels ratolins 280.IgH.IgL.NOD. A causa de la idiosincràsia de la malaltia només es van estudiar a les 5 setmanes d'edat, i no a diferents edats com s'havia realitzat en la soca 280.IgH.NOD.

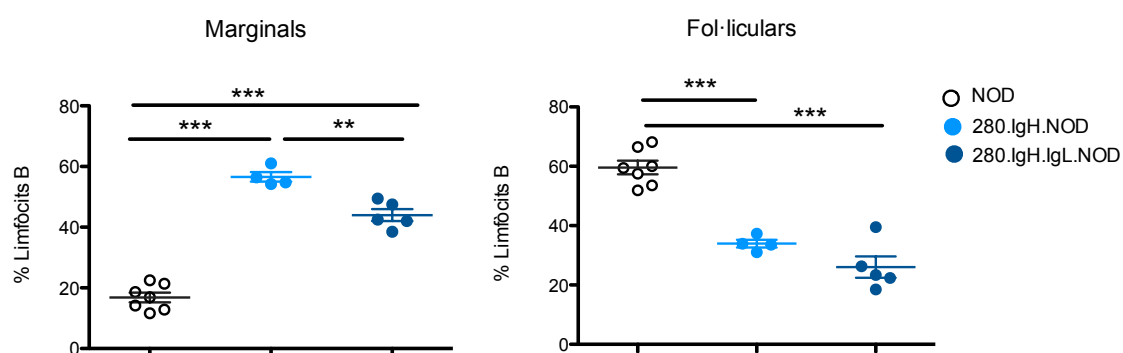
Es van comparar les poblacions de la soca 280.IgH.IgL.NOD amb la dels ratolins de la soca NOD i de la soca 280.IgH.NOD, amb l'objectiu d'identificar els canvis poblacionals i fenotípics que hi havia entre les tres soques, i d'aquesta manera esbrinar quins d'aquests canvis podien estar relacionats amb les diferències evolutives de la malaltia en cada una de les soques.

### **17.1. Limfòcits B fol·liculars, de zona marginal, transicionals de tipus 1 i transicionals de tipus 2**

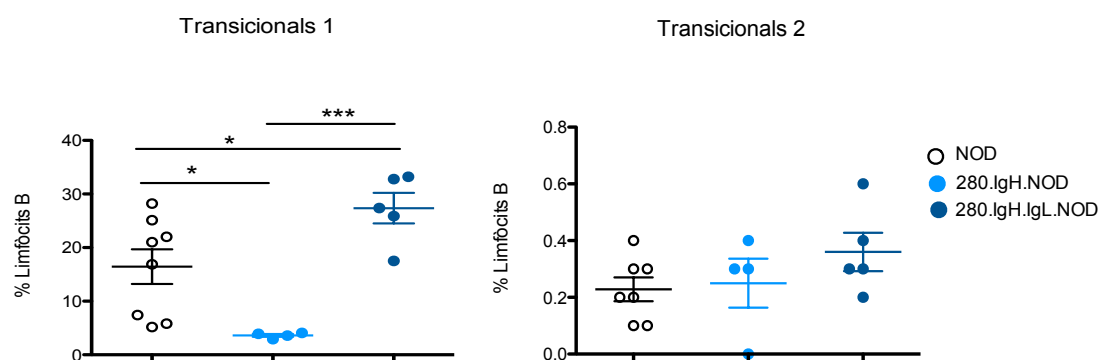
De la mateixa manera que en la soca 280.IgH.NOD, també es van analitzar les subpoblacions cel·lulars presents a la melsa del ratolí doble transgènic. Posteriorment, es van comparar els resultats obtinguts de la soca 280.IgH.IgL.NOD amb els resultats de la soca 280.IgH.NOD i NOD a les 5 setmanes.

Els resultats van indicar que, respecte a la soca NOD, els ratolins de la soca 280.IgH.IgL.NOD presenten una disminució de la població de limfòcits B fol·liculars ( $p\text{-value}<0.0001$ ), i un increment dels limfòcits de la zona marginal ( $p\text{-value}<0.0001$ ), com s'observa a la figura 69. No obstant això, els valors percentuals dels limfòcits de la zona marginal en la soca 280.IgH.IgL.NOD no són tan elevats com els de la soca 280.IgH.NOD ( $p\text{-value}<0.019$ ).

En referència a les poblacions de transicionals, s'observa que la població de limfòcits B transicionals de tipus 1 es troba disminuïda en la soca 280.IgH.IgL.NOD comparada amb les altres dues. La diferència és estadísticament significativa tant quan es compara amb la soca 280.IgH.NOD ( $p\text{-value}<0.001$ ), com amb la soca NOD ( $p\text{-value}=0.0407$ ). En canvi, en les poblacions transicionals de tipus 2 no s'observen diferències entre les diferents soques (Figura 70).



**Figura 69.-** Percentatge de limfòcits B fol·liculars, marginals a les 5 setmanes d'edat. Els limfòcits de ratolí NOD estan representats en blanc, els de 280.IgH.NOD en blau cel i 280.IgH.IgL.NOD en blau marí. Destaca l'augment dels limfòcits B marginals en els 280.IgH.IgL.NOD en comparació amb la disminució dels limfòcits B fol·liculars. Estudi realitzat amb 4-8 femelles.



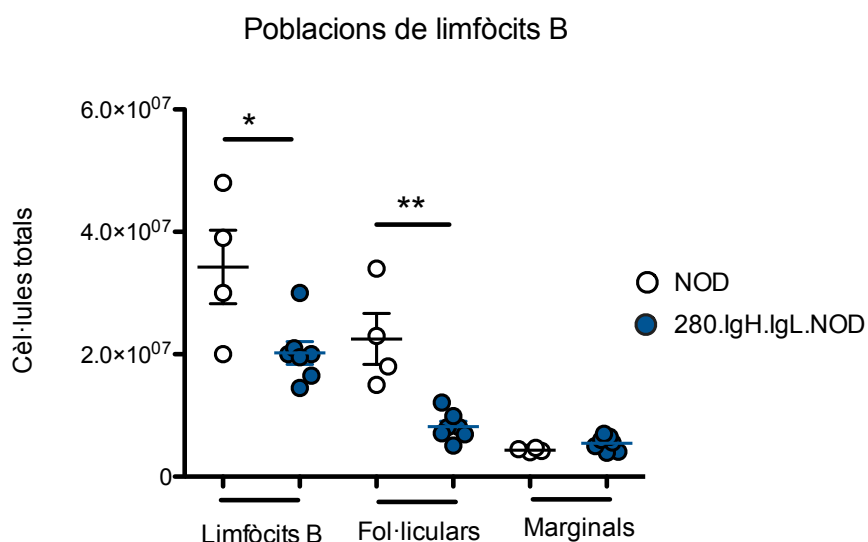
**Figura 70.-** Percentatge de limfòcits B transicionals tipus 1 i tipus 2 a les 5 setmanes d'edat. Els limfòcits de ratolí NOD estan representats en blanc, els de 280.IgH.NOD en blau cel i 280.IgH.IgL.NOD en blau marí. Destaca l'augment dels limfòcits B transicionals de tipus 1. Estudi realitzat en 4-8 femelles.

## 17.2. Estudis dels limfòcits fol·liculars i de zona marginals en nombre absoluts

Igual com s'havia realitzat en els animals de la soca 280.IgH.NOD, es va aprofundir en els estudis de les poblacions de limfòcits B realitzant el comptatge total d'aquestes de les poblacions de limfòcits fol·liculars i de la zona marginal en els ratolins NOD i doble transgènic.

Els resultats van mostrar que les melses dels ratolins transgènics presentaven menys limfòcits B en comparació els NOD ( $p$ -value=0.0208) (Figura 71).

Igual com s'havia observat en els animals portadors del transgen per la cadena pesada, la reducció en el nombre de limfòcits B es traduïa en una baixada en la població de limfòcits fol·liculars, amb una diferència significativa entre els limfòcits fol·liculars procedents de la soca NOD i la 280.IgH.IgL.NOD ( $p$ -value=0.0017). En canvi, pel que fa les cèl·lules de la zona marginal s'observa que els nombres en les dues soques eren molts semblants, com s'observa a la figura 68. Podem per tant conclure que l'expressió del BCR transgènic promou una maduració normal de limfòcits cap a la zona marginal mentre que evita la maduració cap a fol·liculars.

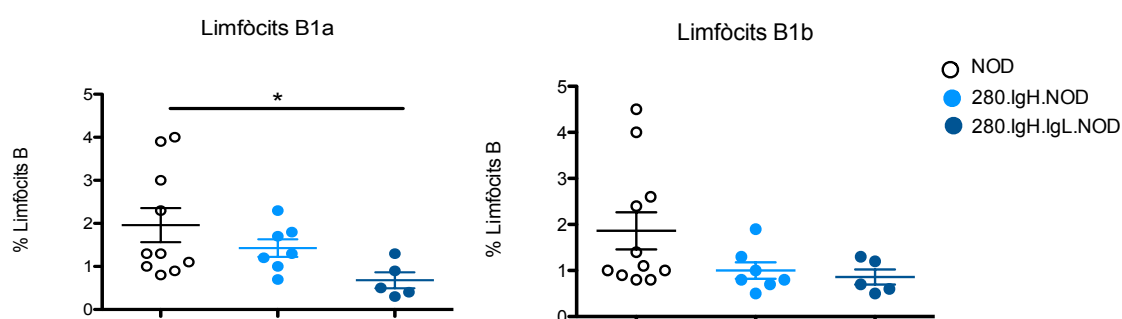


**Figura 71.-** Valors absoluts dels limfòcits presents a melsa i en les poblacions de limfòcits fol·liculars i de la zona marginal. Estudi realitzat en animals de 9 setmanes d'edat (4-6 femelles).

### 17.3. Estudi dels limfòcits B1a i B1b

Es van estudiar altres subpoblacions minoritàries presents a la melsa, contretament, les subpoblacions de limfòcits B1a i B1b presents a melsa a les 5 setmanes d'edat en els animals de la soca doble transgènica.

Es va observar que les poblacions de cèl·lules B1a i B1b de l'animal doble transgènic es troben disminuïdes respecte les altres dues soques (Figura 72). Pel que fa als limfòcits B1b, aquesta diferència no és significativa, però en canvi sí que ho és per a la població de cèl·lules B1a quan es compara amb la soca NOD ( $p$ -value = 0.0268).



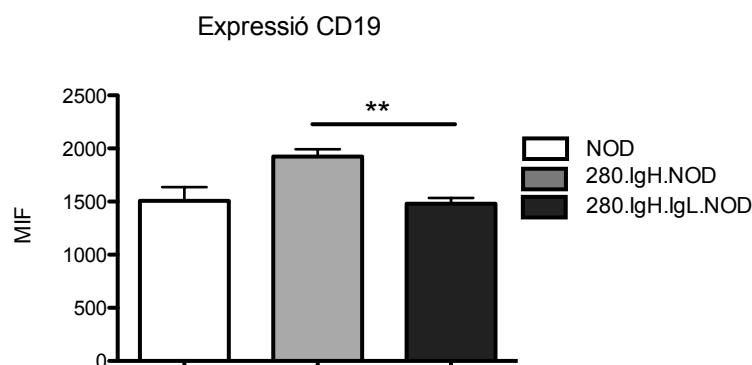
**Figura 72.-** Percentatge de limfòcits B1a i B1b a les 5 setmanes d'edat. Els limfòcits de ratolí NOD estan representats en blanc, els de 280.IgH.NOD en blau cel, i els animals de la soca 280.IgH.IgL.NOD en blau fosc. Estudi realitzat en 5-10 femelles.

## 18.- Estudi fenotípic dels limfòcits B a melsa del ratolí 280.IgH.IgL.NOD

### 18.1. Expressió de la molècula CD19

Igual com s'havia realitzat en la soca 280.IgH.NOD, es van estudiar els nivells d'expressió de la molècula CD19 a la superfície dels limfòcits B procedents de melsa.

Els resultats van mostrar que els limfòcits procedents de la soca 280.IgH.IgL.NOD presentaven uns nivells d'expressió de CD19 semblant als de la soca NOD, però més baixos respecte la soca 280.IgH.NOD ( $p$ -value=0.071), com s'observa a la figura 73.

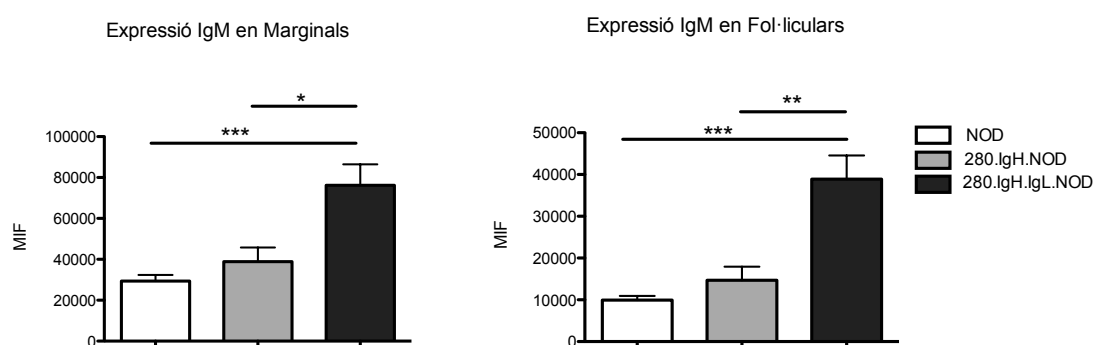


**Figura 73.-** Expressió de la molècula CD19 en funció de la mediana d'intensitat de fluorescència en limfòcits de melsa de ratolins 280.IgH.IgL.NOD, 280.IgH.NOD i NOD. Estudi realitzat en 5 femelles per grup.

## 18.2. Expressió de la IgM

Per l'anàlisi de l'expressió de IgM en els limfòcits procedents de la melsa, es va decidir analitzar l'expressió en funció de les subpoblacions, ja que els canvis en les subpoblacions podria emascarar canvis en l'expressió de la IgM.

Els resultats van mostrar que els limfòcits B procedents de melsa dels animals de la soca doble transgènica expressen nivells més alts de IgM a la seva superfície en comparació les altres dues soques. Aquest increment es dona tant en els limfòcits fol·liculars com en els marginals (Fol·liculars: respecte a NOD  $p\text{-value}<0.0001$ ; respecte a 280.IgH.NOD  $p\text{-value}=0.0014$ . Marginals: respecte a NOD  $p\text{-value}<0.0001$ ; respecte a 280.IgH.NOD  $p\text{-value}=0.0103$ ) (Figura 74).

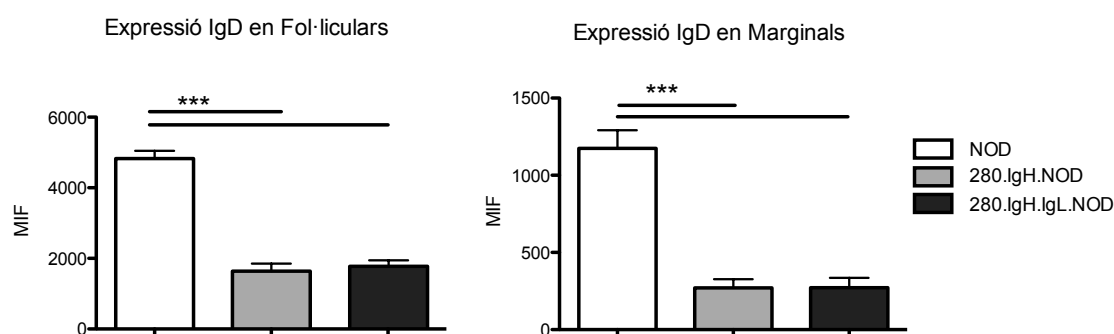


**Figura 74.-** Expressió de la molècula de IgM en funció de la mediana d'intensitat de fluorescència (MIF) en limfòcits B fol·liculars i de zona marginals de melsa de ratolins 280.IgH.IgL.NOD, 280.IgH.NOD i NOD. Estudi realitzat en 5 femelles per grup.

### 18.3. Expressió de la IgD

L'altra immunoglobulina que s'expressa de forma transgènica a la superfície dels limfòcits B és la immunoglobulina D. Resultava molt interessant estudiar l'expressió d'aquesta molècula, pel fet que ja s'havien observat diferències en l'expressió d'aquesta molècula, entre les soques NOD i 280.IgH.NOD.

Els resultats van mostrar uns valors molt semblants als obtinguts en l'anàlisi de la soca 280.IgH.NOD. Així doncs, al igual que aquest última, la soca 280.IgH.IgL.NOD presenta una disminució significativa dels nivells d'expressió de IgD a la superfície dels limfòcits B de la melsa, en comparació amb la soca NOD, com s'observa a la figura 75 (Fol·liculars  $p\text{-value}<0.0001$ ; Marginals  $p\text{-value}<0.0001$ ).



**Figura 75.-** Expressió de la molècula de IgD en funció de la mediana d'intensitat de fluorescència (MIF) en limfòcits B fol·liculars i de zona marginals de les soques 280.IgH.IgL.NOD, 280.IgH.NOD i NOD. Estudi realitzat en 5 animals per grup.

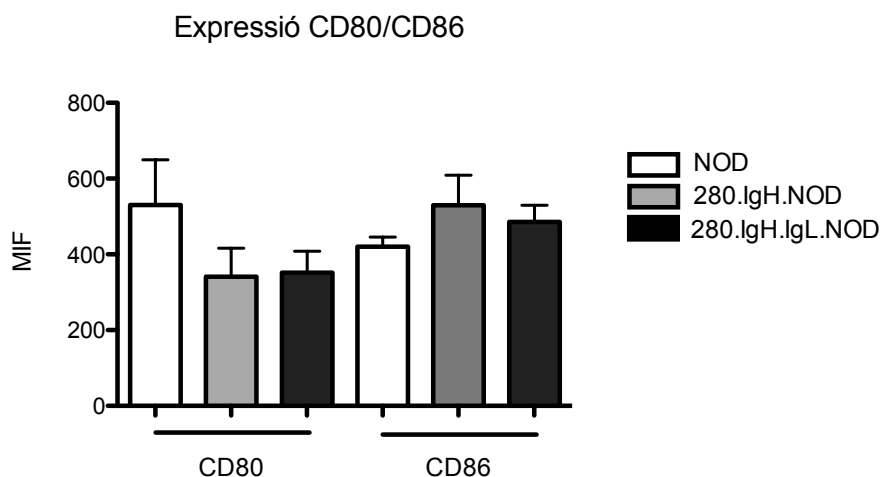
### 18.4. Expressió de molècules coestimuladores i MHC

#### 18.4.1. Expressió de CD80 i CD86

Altres molècules que es van estudiar van ser les molècules de coestimulació CD80 i CD86.

Els resultats van mostrar que hi havia una disminució de l'expressió de la molècula CD80 en els limfòcits B procedents de la soca 280.IgH.IgL.NOD en

comparació els de soca NOD. En canvi, es va observar un augment de l'expressió de la molècula CD86 en els limfòcits B procedents de la soca 280.IgH.IgL.NOD en comparació els procedents de la soca NOD. En cap dels casos les diferències van resultar ser estadísticament significatives, com s'observa en la figura 76.

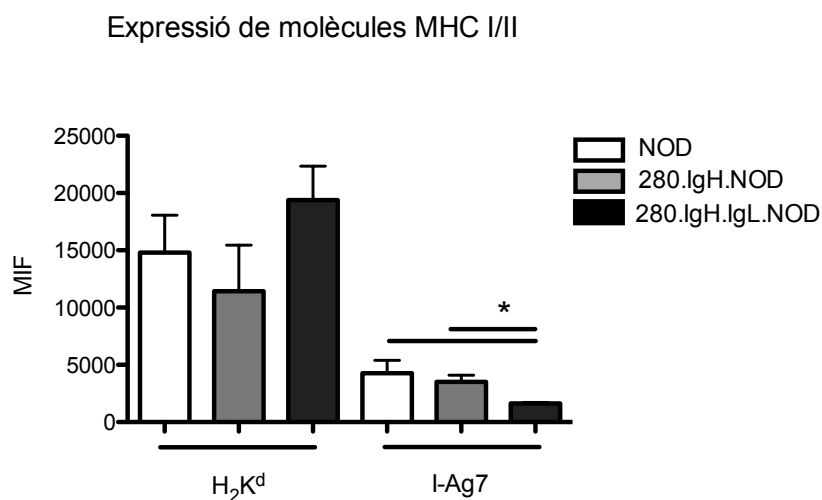


**Figura 76.-** Expressió de la molècula CD80 i CD86 en funció de la mediana d'intensitat de fluorescència en limfòcits de melsa de ratolins 280.IgH.IgL.NOD, 280.IgH.NOD i NOD. Estudi realitzat en 5 femelles per grup.

#### 18.4.2. Expressió $H_2k^d$ i I-Ag7

Juntament amb les molècules coestimuladores, es va estudiar l'expressió d'altres molècules involucrades en la presentació antigènica, les molècules MHC de classe I i II.

Els resultats obtinguts van mostrar un increment de la molècula de MHC de classe I dels limfòcits B procedents de la 280.IgH.IgL.NOD respecte als de la soca NOD. No obstant això, les diferències no van resultar estadísticament significatives. En canvi, es va observar un descens de la molècula de MHC de classe II en els limfòcits B de la soca 280.IgH.IgL.NOD respecte les altres dues soques (Respecte a NOD  $p$ -value=0.0186 ; Respecte a 280.IgH.NOD  $p$ -value= 0.0303) (Figura 77).



**Figura 77.-** Expressió de la molècula H<sub>2</sub>k<sup>d</sup> i I-Ag7 en funció de la mediana d'intensitat de fluorescència en limfòcits de melsa de ratolins 280.IgH.IgL.NOD, 280.IgH.NOD i NOD. Estudi realitzat en 5 femelles per grup.

## 19.- Anàlisi de l'infiltrat leucocitari de la soca 280.IgH.IgL.NOD

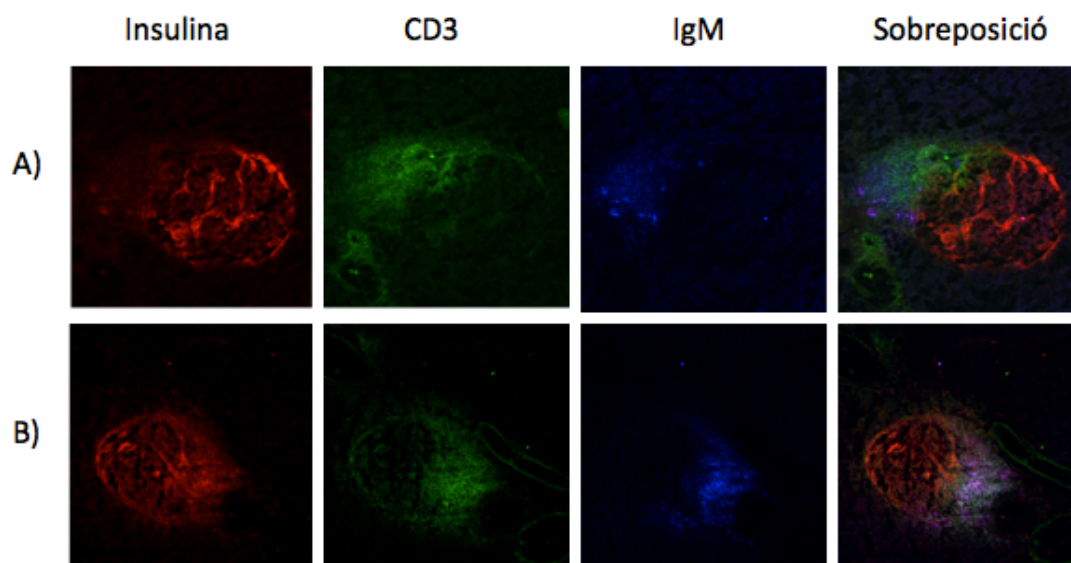
Per conèixer més a fons el paper que duen a terme els limfòcits B dels ratolins 280.IgH.IgL.NOD en el decurs de la diabetis, es van realitzar estudis dels limfòcits que es troben presents en l'infiltrat leucocitari als illots. Es van fer estudis de distribució dels limfòcits a l'infiltrat mitjançant tincions d'immunofluorescència. I es va estudiar la població infiltrant mitjançant citometria de flux.

### **19.1. Distribució dels limfòcits T i B en l'infiltrat dels illots pancreàtics**

Per tal d'analitzar la distribució dels limfòcits T i B infiltrants en els illots pancreàtics, es va realitzar una tinció histològica sobre el pàncrees utilitzant anticossos per marcar específicament els limfòcits B i T (anti-CD19 i anti-CD3, respectivament). També es va utilitzar un anticòs que reconeixia la insulina per poder localitzar millor els illots (Figura 78).



En comparar els resultats de les immunofluorescències es van observar diferències entre la soca NOD no transgènica (imatge A de la figura 76) i els ratolins transgènics 280.IgH.IgL.NOD (imatge B de la figura 76). Igual com s'havia observat anteriorment en els animals 280.IgH.NOD, transgènics per a la cadena pesada, els limfòcits B i T infiltrants a l'illot pancreàtic de la soca 280.IgH.IgL.NOD es distribueixen d'una manera més heterogènia en comparació els ratolins NOD, que presenten un infiltrat a on les dues poblacions limfocitàries es troben en diferents àrees de l'infiltrat.

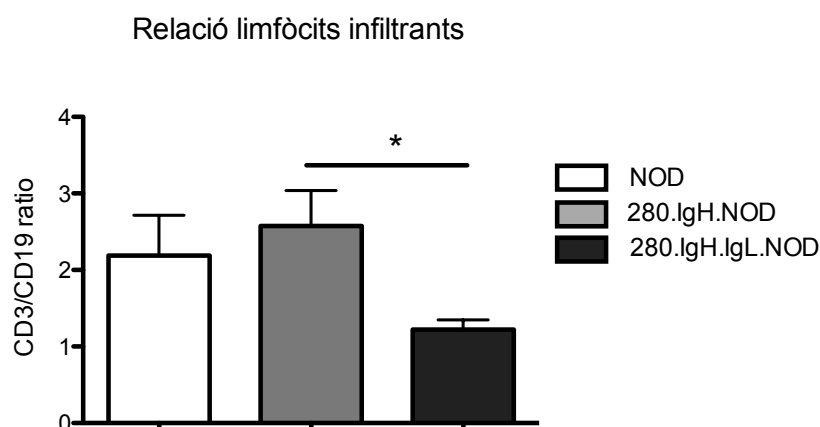


**Figura 78.-** A) Tinció sobre pàncrees de ratolins de 9 setmanes d'edat de la soca NOD i B) 280.IgH.IgL.NOD. Als quals s'ha marcat la insulina (vermell), els limfòcits T (CD3, verd) i els limfòcits B (IgM, blau). Les imatges preses a 25 augments.

## 19.2. Relació dels limfòcits T i B en l'infiltrat

Després d'observar diferències en la distribució de l'infiltrat leucocitari entre la soca 280.IgH.IgL.NOD respecte de la soca NOD, es va analitzar per citometria si hi havia diferències en la proporció de limfòcits T i B que colonitzen els illots de la soca 280.IgH.IgL.NOD respecte a les altres dues.

Els resultats observats van mostrar que en l'infiltrat de la soca 280.IgH.IgL.NOD hi ha més presència de limfòcits B, per això la relació entre limfòcits T (CD3+) i els limfòcits B (CD19+) és més petita. La diferència entre la proporció dels limfòcits infiltrants als illots pancreàtics va esdevenir significativa quan es van comparar els infiltrats de la soca 280.IgH.IgL.NOD i la soca 280.IgH.NOD ( $p$ -value=0.0220), com s'observa a la figura 79.



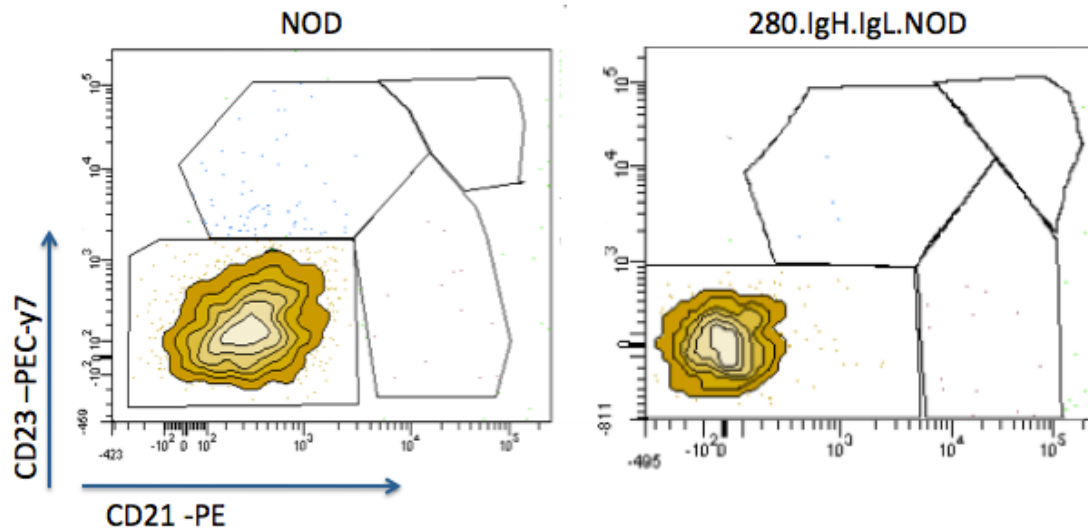
**Figura 79.-** Relació de limfòcits T respecte limfòcits B que es troben infiltrant els illots. S'han utilitzat 5 femelles de 9-10 setmanes d'edat per a cada una de les soques.

### 19.3. Caracterització dels limfòcits B infiltrants a illot pancreàtic

Per tal de conèixer més a fons l'origen i les característiques dels limfòcits B infiltrants a illot, es va realitzar un estudi fenotípic mitjançant citometria de flux. Es van analitzar els limfòcits B amb els mateixos marcadors que s'utilitzen per caracteritzar les subpoblacions de limfòcits B de la melsa, és a dir els marcadors CD21, CD23, IgD i IgM.

Els resultats d'aquesta caracterització van mostrar que, igual que en la soca NOD i la soca 280.IgH.NOD, els limfòcits B infiltrants tenen un fenotip semblant al de les cèl·lules transicionals de tipus 1, com s'observa en la figura 80, és a dir, expressen nivells baixos tant de CD21 com de CD23.

En canvi, els nivells d'expressió de les immunoglobulines M i D és diferent en comparació les altres soques. Aquests resultats es mostren i comenten més endavant, on es comparen les expressions d'aquestes molècules dels limfòcits B procedents de la melsa amb els limfòcits B infiltrants als illots.



**Figura 80.-** Imatges representatives dels resultats de les citometries de flux realitzades en limfòcits B infiltrants a illot en la soca NOD i 280.IgH.IgL.NOD. S'observa que els limfòcits infiltrants presenten un fenotip semblant al de les cèl·lules transicionals de tipus 1, pel que fa als marcadors CD21 i CD23.

## 20.- Comparació d'expressió de molècules en els limfòcits B de melsa i infiltrants als illots pancreàtics

Un cop analitzades les diferents poblacions cel·lulars, es va aprofundir en l'expressió de diferents molècules a la superfície cel·lular dels limfòcits. Es van realitzar aquests estudis amb l'objectiu d'observar diferències en l'expressió de molècules entre els limfòcits B de les diferents soques, per tal que les diferències observades en permetessin obtenir una idea del mecanisme mitjançant el qual els limfòcits B dels ratolins 280.IgH.IgL.NOD, duen a terme el seu rol promotor de la diabetis.

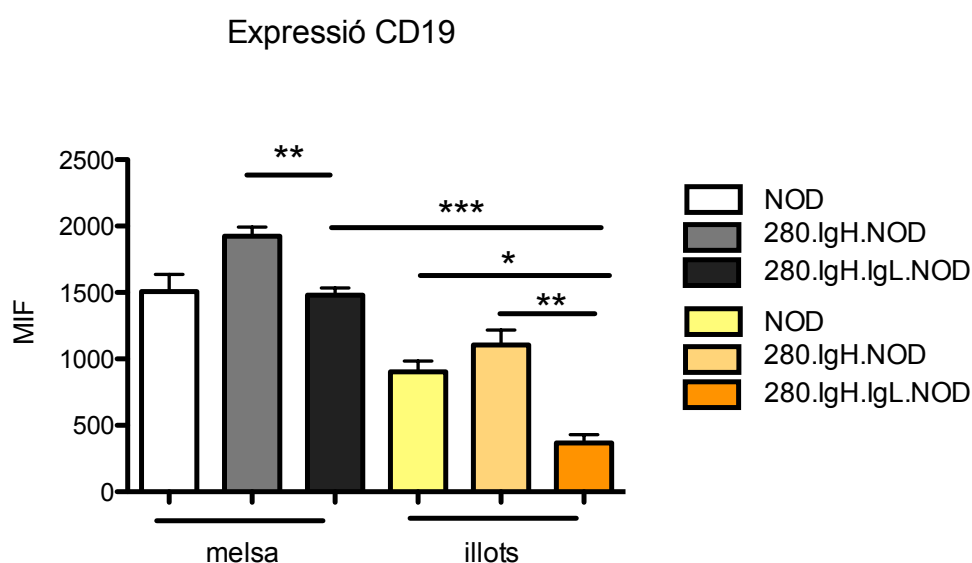
Es va comparar l'expressió de les diferents molècules a la superfície dels limfòcits B procedents de la soca 280.IgH.IgL.NOD a les 9 setmanes d'edat.

Es van comparar aquests resultats amb els obtinguts amb els animals de la soca 280.IgH.NOD. Tot i que els estudis d'aquests animals s'havien realitzat a les 12 setmanes, es va decidir comparar-los encara que fossin animals de diferents edats, ja que a les 12 setmanes la majoria dels animals de la soca 280.IgH.IgL.NOD ja han desenvolupat la malaltia. Per tant, podem considerar que els animals estudiats es trobaven en una fase tardana de la malaltia.

## 20.1. Expressió de la molècula CD19

Com s'havia realitzat anteriorment es va analitzar l'expressió de la molècula CD19, molècula característica dels limfòcits B.

Els resultats es van mostrar que, en la soca 280.IgH.IgL.NOD, l'expressió de la molècula CD19 es troba disminuïda en els limfòcits B procedents de l'infiltrat respecte als de melsa ( $p\text{-value}=0.002$ )(Figura 81). Quan es va comparar l'expressió d'aquesta molècula respecte les altres soques es va observar que els limfòcits B que es trobaven infiltrant els illots, es va observar una baixada significativa de l'expressió de CD19 respecte les altres dues soques (Respecte a NOD  $p\text{-value}=0.0142$  ; Respecte a 280.IgH.NOD  $p\text{-value}=0.0049$ ).



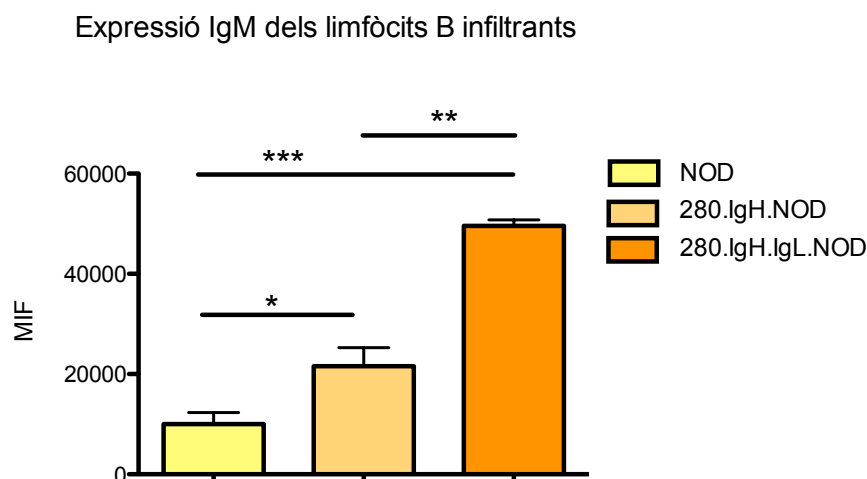
**Figura 81.-** Expressió de la molècula de CD19 en funció de la mediana d'intensitat de fluorescència en limfòcits B procedents de melsa i d'infiltrat leucocitari als illots. Estudi realitzat amb 3-10 femelles per grup.

## 20.2. Expressió de la IgM

També es va analitzar l'expressió de la immunoglobulina M a la superfície cel·lular dels limfòcits B que es trobaven infiltrant als illots pancreàtics.

Els resultats obtinguts també van mostrar un augment de l'expressió de la IgM en la soca 280.IgH.IgL.NOD comparat tant amb els ratolins 280.IgH.NOD com amb els NOD. Anteriorment ja s'havia descrit un augment de l'expressió de la IgM en els limfòcits infiltrants procedents de la soca transgènica 280.IgH.NOD, però els resultats van mostrar un augment encara més notori quan es va comparar la soca

NOD amb la doble transgènica, com es mostra a la figura 82. L'increment va ser significatiu tant respecte a la població de la soca NOD ( $p\text{-value}<0.0001$ ) com respecte a la població de la soca 280.IgH.NOD ( $p\text{-value}=0.015$ ).



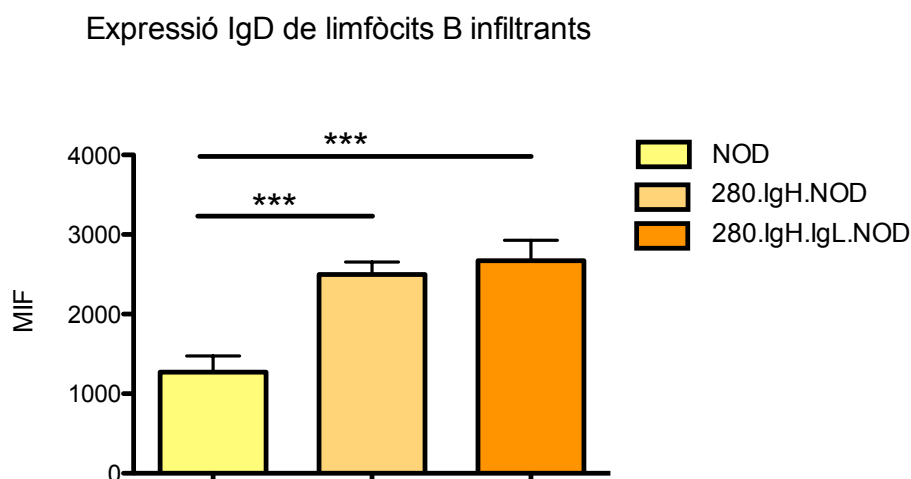
**Figura 82.-** Expressió de la molècula de IgM en funció de la mediana d'intensitat de fluorescència en limfòcits B procedents d'infiltrat leucocitari als illots. Estudi realitzat amb 5 femelles per grup de 9-12 setmanes d'edat.

### 20.3. Expressió de la IgD

L'altra immunoglobulina que s'expressa de forma transgènica a la superfície dels limfòcits B és la immunoglobulina D. Ens resultava molt interessant estudiar l'expressió d'aquesta molècula, pel fet que ja s'havien observat diferències, en l'expressió d'aquesta molècula, entre les soques NOD i 280.IgH.NOD.

També es van avaluar i comparar els nivells d'expressió de la IgD en els limfòcits B que es trobaven infiltrant als illots pancreàtics procedents de la soca 280.IgH.IgL.NOD, amb els de les soques 280.IgH.NOD i NOD.

Els resultats van mostrar un augment significatiu de l'expressió de la IgD respecte a la soca NOD ( $p\text{-value}<0.0001$ ). En canvi, no es van observar diferències d'expressió entre les dues soques transgèniques, tal i com es mostra a la figura 83.



**Figura 83.-** Expressió de la molècula de IgD en funció de la mediana d'intensitat de fluorescència en limfòcits B procedents d'infiltrat leucocitari als illots pancreàtics. Estudi realitzat amb 5 femelles per grup de 9-12 setmanes d'edat.

## 20.4. Expressió de molècules coestimuladores i MHC

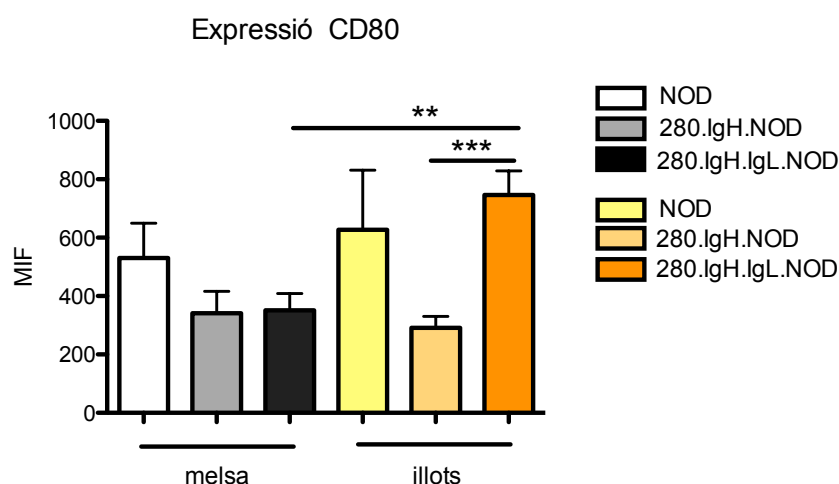
Per analitzar el paper dels limfòcits B com a cèl·lules presentadores d'antigen es va estudiar l'expressió de les molècules coestimuladores B7 a la superfície cel·lular, i es va comparar l'expressió d'aquestes molècules en els limfòcits B presents a la melsa i els presents en l'infiltrat leucocitari als illots, en les tres soques de ratolí.

### 20.4.1 .Expressió de CD80

Una de les molècules que formen el grup de les molècules coestimuladores B7 és la molècula CD80. Es va analitzar l'expressió d'aquesta molècula en els limfòcits B de soca 280.IgH.IgL.NOD, i es va comparar amb l'expressió amb la dels limfòcits B procedents de les altres dues soques.

Els resultats obtinguts mostren una menor expressió de CD80 en els limfòcits B procedents de la melsa dels ratolins 280.IgH.IgL.NOD respecte els de la soca NOD, però semblants als dels limfòcits procedents de la soca amb el transgen per a la cadena pesada. Aquestes diferències es poden apreciar a la figura 84. Tot i que s'observa un descens, no hi ha significança estadística. On sí s'observa una diferència estadística és quan es compara l'expressió d'aquesta molècula en la soca 280.IgH.IgL.NOD entre els limfòcits procedents de melsa i els procedents de

l'infiltrat al illots. En aquest cas s'observa un increment d'expressió de la molècula CD80 en els limfòcits B procedents de l'infiltrat als illots ( $p\text{-value}=0.0050$ ). No obstant això, l'expressió de CD80 només és diferent respecte la soca que expressa el transgen per a cadena pesada ( $p\text{-value}=0.0001$ ), però no pels limfòcits procedents de la soca NOD.



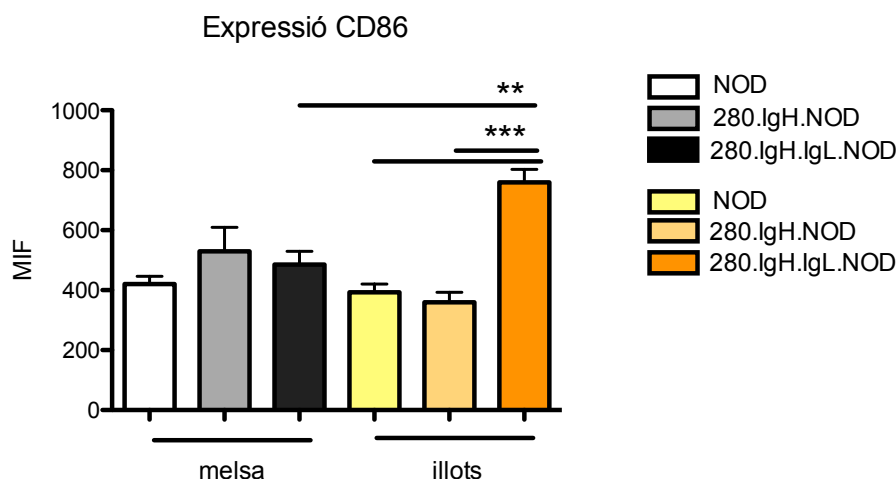
**Figura 84.-** Expressió de la molècula de CD80 en funció de la mediana d'intensitat de fluorescència en limfòcits B procedents de melsa i d'infiltrat leucocitari dels illots. Estudi realitzat amb 10 femelles per grup de 9-12 setmanes d'edat.

#### 20.4.2. Expressió de CD86

L'altra molècula que forma part de les molècules coestimuladores B7 és la molècula CD86.

Després d'analitzar l'expressió d'aquesta molècula, es va observar un clar increment d'expressió de la molècula CD86 en els limfòcits B infiltrants als illots en la soca 280.IgH.IgL.NOD, com s'observa a la figura 85. Aquest increment d'expressió és estadísticament significatiu respecte dels altres limfòcits B procedents dels illots (Respecte de NOD  $p\text{-value}<0.0001$ ; Respecte de 280.IgH.NOD  $p\text{-value}<0.0001$ ). I també és significatiu respecte dels limfòcits B procedents de melsa de la mateixa soca ( $p\text{-value}=0.015$ ).

Aquests resultats, juntament amb els de l'estudi de les molècules coestimuladores després de la proliferació, apuntarien que els canvis d'expressió de la molècula CD86 podria tenir un paper rellevant en el decurs de la malaltia. Aquest punt es tractarà més a fons a la discussió.

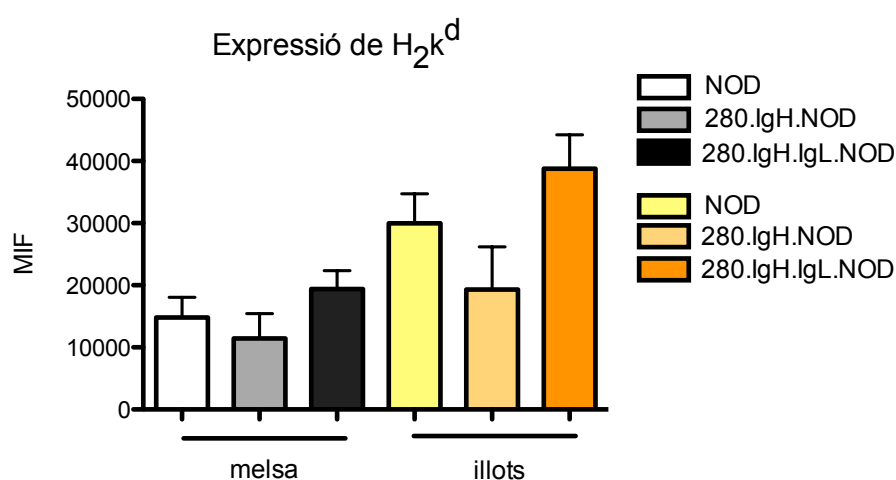


**Figura 85.-** Expressió de la molècula de CD86 en funció de la mediana d'intensitat de fluorescència en limfòcits B procedents de melsa i d'infiltrat leucocitari als illots. Estudi realitzat amb 10 femelles per grup.

### 20.4.3. Expressió $H_2k^d$

Una de les altres molècules analitzades va ser la molècula de MHC de classe I,  $H_2K^d$ .

Els resultats d'expressió d'aquestes molècules van mostrar una tendència, no estadísticament significativa, que mostra un augment d'expressió d'aquesta molècula en els limfòcits B procedents de melsa i procedents de l'infiltrat als illots pancreàtics de la soca doble transgènica, en comparació les altres dues soques. Aquests increments observats són una tendència que podrien esdevenir estadísticament significatius al incrementar la mida mostral (Figura 86).



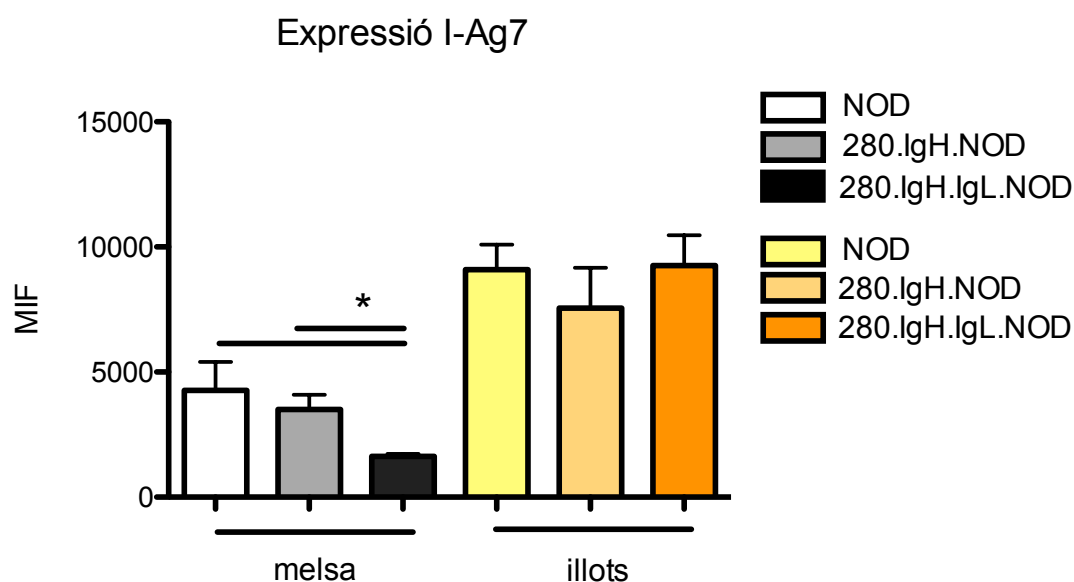
**Figura 86.-** Expressió de la molècula de  $H_2K^d$  en funció de la MIF en limfòcits B procedents de melsa i d'infiltrat leucocitari als illots. Estudi realitzat amb 3-7 animals per grup.



#### 20.4.4. Expressió I-Ag7

La última molècula que es va analitzar va ser la molècula de MHC de classe II, I-Ag7.

Els resultats observats van mostrar un descens d'expressió de la molècula de MHC de classe II en els limfòcits procedents de melsa en la soca doble transgènica, en comparació les altres dues (Respecte a NOD  $p$ -value=0.0485; Respecte a 280.IgH.NOD  $p$ -value=0.0303). En canvi, l'expressió de la molècula I-Ag7 en els limfòcits B procedents de l'infiltrat leucocitari als illots mostra uns nivells d'expressió similars a les altres dues soques, com s'observa a la figura 87.



**Figura 87.-** Expressió de la molècula de I-Ag7 en funció de la mediana d'intensitat de fluorescència en limfòcits B procedents de melsa i d'infiltrat leucocitari als illots. Estudi realitzat amb 3-7 animals per grup.

## 21.- Estudi dels limfòcits B a la cavitat peritoneal

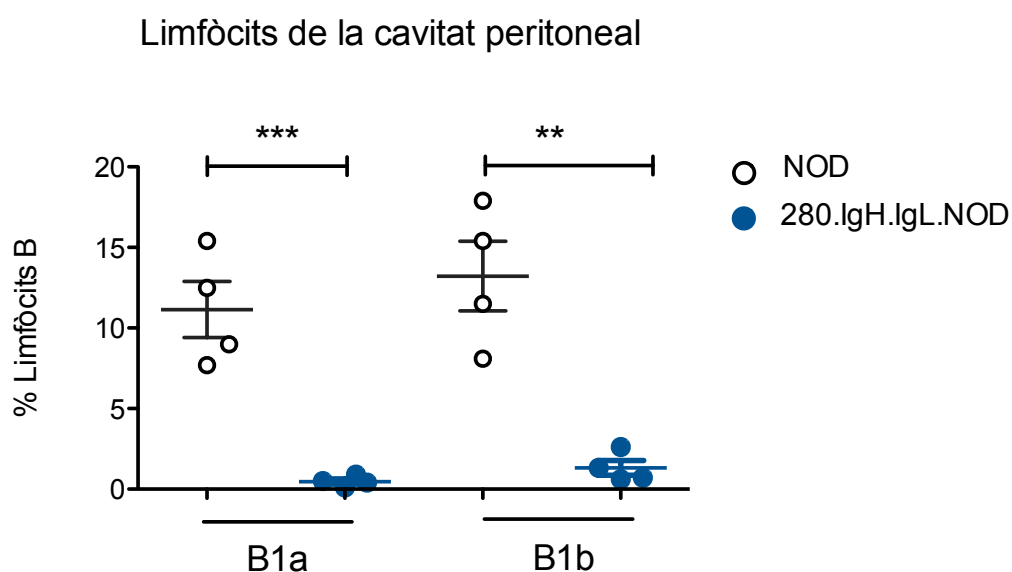
Com a conseqüència de les diferències observades, entre les soques NOD i 280.IgH.NOD, en les subpoblacions de limfòcits B presents a la cavitat peritoneal, es van estudiar les subpoblacions de cèl·lules B1a i B1b presents a la cavitat peritoneal en la soca 280.IgH.IgL.NOD.

## 21.1. Poblacions B1 a la cavitat peritoneal

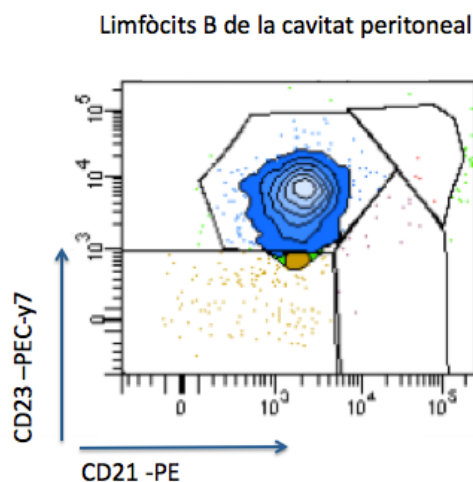
L'estudi les subpoblacions de B1a i B1b en aquesta cavitat es va realitzar mitjançant citometria de flux, utilitzant els mateixos criteris utilitzats per estudiar aquestes poblacions a la melsa. Es va analitzar l'expressió de CD43, IgM i CD5 per diferenciar entre B1a i B1b. Els estudis es van dur a terme a les 6 setmanes d'edat.

Els resultats van mostrar que en els ratolins 280.IgH.IgL.NOD ambdues poblacions B1 es troben disminuïdes, comparades amb les poblacions B1 dels seus germans no transgènics (Figura 88). La diferència entre les poblacions és estadísticament significativa, tant per a la subpoblació B1a ( $p\text{-value}=0.0009$ ), com per a la població B1b ( $p\text{-value}=0.0017$ ).

Pel que fa la població de limfòcits B2 presents a la cavitat peritoneal, els resultats són molt semblants en els observats en la soca 280.IgH.NOD. És a dir, la majoria de limfòcits B presents a la cavitat peritoneal són de fenotip fol·licular, com s'observa a la imatge 89.



**Figura 88.-** Percentatge de limfòcits B1a i B1b a la cavitat peritoneal a les 6 setmanes d'edat. Els limfòcits de ratolí NOD estan representats amb blanc i els del ratolí 280.IgH.IgL.NOD en blau. S'observa una disminució de les dues poblacions en la soca 280.IgH.IgL.NOD respecte els seus germans no transgènics. Estudi realitzat en 4 femelles.



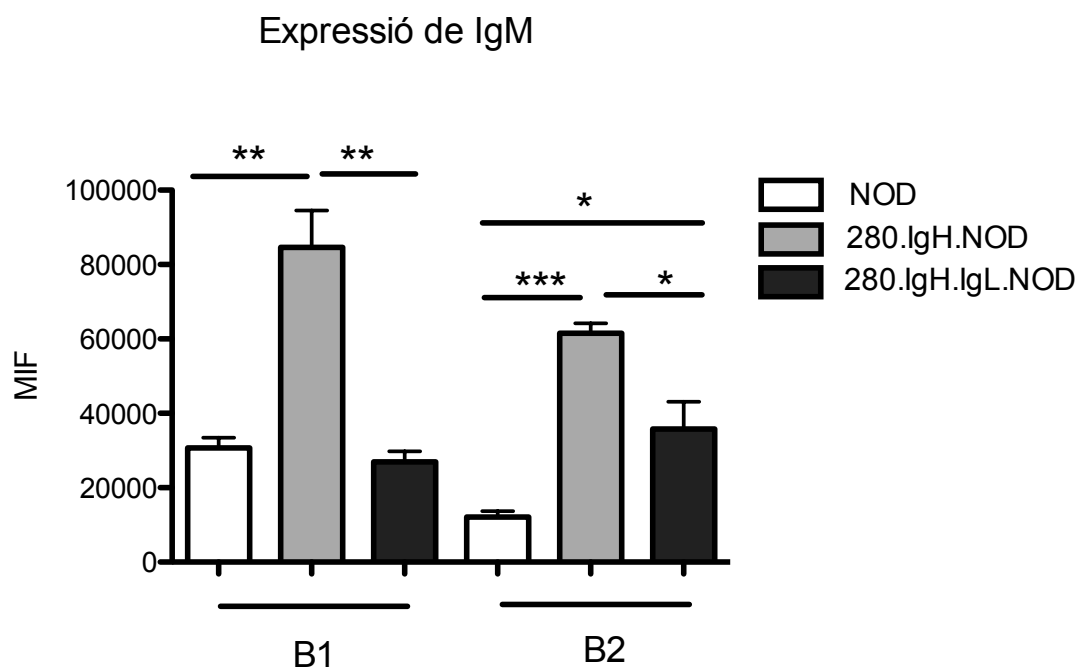
**Figura 89.-** Imatge representativa de la citometria realitzada en els limfòcits B de la cavitat peritoneal de la soca 280.IgH.IgL.NOD.

## 21.2. Expressió de IgM en poblacions B1 i B2

Igual com s'havia realitzat en la soca 280.IgH.NOD, es van estudiar les diferències d'expressió de IgM en les cèl·lules peritoneals.

A diferència dels resultats observats en la soca 280.IgH.NOD, els canvis en l'expressió de IgM en la soca doble transgènica és semblant amb la de la soca NOD, com s'aprecia a la figura 90. Així, pel que fa el nivell d'expressió d'IgM en la subpoblació de cèl·lules B1 no es van trobar diferències entre la soca NOD i la soca 280.IgH.IgL.NOD, però sí en comparació a la soca 280.IgH.NOD ( $p$ -value= 0.0014).

Respecte a la subpoblació B2, es va observar un increment d'expressió de IgM en la soca 280.IgH.IgL.NOD respecte a la soca NOD, ( $p$ -value=0.026). Tanmateix, aquest increment d'expressió no arriba als nivells de la soca transgènica per a la cadena pesada, que expressa nivell més alts de IgM a la seva superfície cel·lular ( $p$ -vaule=0.0413).



**Figura 90 .-**Representació de l'expressió de IgM en els limfòcits B1 i B2 a la cavitat peritoneal a les 6 setmanes d'edat. S'observa una expressió semblant de IgM de la soca 280.IgH.IgL.NOD respecte la soca NOD en la població B1, i un augment de l'expressió de la IgM en la població B2. En canvi, respecte la soca 280.IgH.NOD s'observen nivells més altes en ambdues subpoblacions peritoneals respecte les altres dues soques. Representada la mitjana (amb desviació estandard) de 3 femelles.

## 22.- Resum dels resultats observats

### **22.1. Evolució de la malaltia en les diferents soques.**

	NOD.Per-/-	280.IgH.NOD	280.IgH.NOD.Per-/-	280.IgH.IgL.NOD
Incidència T1D	Incidència semblant a la soca NOD ( 84%)	Increment de la incidència (97%)	Incidència semblant a la soca NOD (73%)	Increment de la incidència (100%)*
Debut	Edats més grans (endarreriment)	Edats més joves (acceleració)	Sense diferències	Edats més joves (acceleració)*
Insulitis score	Evolució més lenta de la infiltració	Evolució més accelerada de la infiltració	No realitzat	No realitzat

**Taula 17.-** Resum de l'evolució de la T1D en les diferents soques estudiades. \*Increment respecte de la soca NOD i la soca 280.IgH.NOD

## 22.2. Limfòcits B presents a melsa

	NOD	280.IgH.NOD	280.IgH.IgL.NOD
Percentatge subpoblacions	20% MZ, 60% FO, 10% T1	55% MZ, 35% FO, 5% T1	40% MZ, 25% FO, 25% T1
Fenotip estat basal	CD19 <sup>++</sup> , IgM <sup>+</sup> , IgD <sup>+++</sup> CD80 <sup>++</sup> , CD86 <sup>+</sup> H <sub>2</sub> K <sup>d</sup> <sup>+++</sup> , I-Ag7 <sup>++</sup>	CD19 <sup>+++</sup> , IgM <sup>+</sup> , IgD <sup>+</sup> CD80 <sup>+</sup> , CD86 <sup>+</sup> H <sub>2</sub> K <sup>d</sup> <sup>+++</sup> , I-Ag7 <sup>++</sup>	CD19 <sup>++</sup> , IgM <sup>+++</sup> , IgD <sup>+</sup> CD80 <sup>+</sup> , CD86 <sup>+</sup> H <sub>2</sub> K <sup>d</sup> <sup>+++</sup> , I-Ag7 <sup>+</sup>
Fenotip després estímul amb LPS	CD21 <sup>+</sup> , CD23 <sup>-</sup> CD80 <sup>++</sup> , CD86 <sup>+</sup> H <sub>2</sub> K <sup>d</sup> <sup>+++</sup> , I-Ag7 <sup>++</sup>	CD21 <sup>+</sup> , CD23 <sup>-</sup> CD80 <sup>++</sup> , CD86 <sup>+</sup> H <sub>2</sub> K <sup>d</sup> <sup>+++</sup> , I-Ag7 <sup>++</sup>	No analitzat
Fenotip després estímul amb anti-BCR	CD21 <sup>+</sup> , CD23 <sup>+</sup> CD80 <sup>++</sup> , CD86 <sup>+</sup> H <sub>2</sub> K <sup>d</sup> <sup>+++</sup> , I-Ag7 <sup>++</sup>	CD21 <sup>+</sup> , CD23 <sup>+</sup> CD80 <sup>++</sup> , CD86 <sup>+</sup> H <sub>2</sub> K <sup>d</sup> <sup>+++</sup> , I-Ag7 <sup>++</sup>	No analitzat
Fenotip després estímul amb CD40 +Il4	CD21 <sup>+</sup> , CD23 <sup>++</sup> CD80 <sup>++</sup> , CD86 <sup>+</sup> H <sub>2</sub> K <sup>d</sup> <sup>+++</sup> , I-Ag7 <sup>++</sup>	CD21 <sup>+</sup> , CD23 <sup>++</sup> CD80 <sup>++</sup> , CD86 <sup>+</sup> H <sub>2</sub> K <sup>d</sup> <sup>+++</sup> , I-Ag7 <sup>++</sup>	No analitzat
Proliferació amb LPS	+++	+++	No analitzat
Proliferació amb anti-BCR	+++	+	No analitzat
Proliferació amb CD40 +Il-4	++	++	No analitzat
Proliferació (sense selecció negativa) amb anti-BCR	+++	+	No analitzat
Proliferació (sense selecció negativa) amb perforina	-	+	No analitzat

**Taula 18.-** Resum dels resultats observats en els limfòcits B procedents de la melsa.

### 22.3. Limfòcits B present en l'infiltrat leucocitari als illots pancreàtics

	NOD	280.IgH.NOD	280.IgH.IgL.NOD
Percentatge subpoblacions	100% CD21-, CD23- (T1-like)	100% CD21-, CD23- (T1-like)	100% CD21-, CD23- (T1-like)
Fenotip estat basal	CD19++, IgM+, IgD+ CD80++, CD86+ H <sub>2</sub> K <sup>d</sup> ++ I-Ag7+++	CD19++, IgM++, IgD+++ CD80+, CD86+ H <sub>2</sub> K <sup>d</sup> ++ I-Ag7+++	CD19+, IgM+++, IgD+++ CD80+++ CD86+++ H <sub>2</sub> K <sup>d</sup> +++ I-Ag7+++
Fenotip després estímul amb LPS	CD21+/-, CD23+/-	CD21+/-, CD23+/-	No analitzat
Fenotip després estímul amb anti-BCR	CD21-, CD23-	CD21-, CD23-	No analitzat
Fenotip després estímul amb CD40 +IL4	CD21+, CD23++	CD21+, CD23++	No analitzat
Proliferació (sense selecció negativa) amb LPS	+++	+++	No analitzat
Proliferació (sense selecció negativa) amb anti-BCR	++	++	No analitzat
Proliferació (sense selecció negativa) amb CD40 +IL 4	++	++	No analitzat

**Taula 19.-** Resum dels resultats observats en els limfòcits B procedents de l'infiltrat leucocitari als illots pancreàtics.

## 22.4. Limfòcits B presents a la cavitat peritoneal

	NOD	280.IgH.NOD	280.IgH.IgL.NOD
Percentatge subpoblacions	30% B1 70% B2	<5% B1 >95% B2	<5% B1 >95% B2
Expressió IgM	B1:++ B2:+	B1:+++ B2:+++	B1:++ B2:++

**Taula 20.-** Resum dels resultats observats en els limfòcits B procedents de la cavitat peritoneal.





## VII- DISCUSSIÓ



Els models animals s'utilitzen per a l'estudi dels mecanismes patològics que es troben implicats en moltes malalties humanes, i suposen una eina molt útil per a la comprensió dels processos fisiopatològics que es duen a terme en el decurs de la malaltia. Els estudis amb models animals permeten obtenir coneixement *in vivo* dels diferents processos de la malaltia que difícilment es podria obtenir mitjançant altres mètodes.

En el cas de l'estudi de la diabetis mellitus tipus 1, la inaccessibilitat a l'hora d'obtenir mostres humanes fa especialment necessari l'ús dels models animals. Un dels models animals més usat és el ratolí NOD, ja que pateix un tipus de diabetis autoimmunitària amb moltes semblances amb la diabetis tipus 1 humana<sup>193</sup>.

Estudis realitzats en aquest model animal han permès descriure i entendre millor la patologia, identificar *loci* de susceptibilitat a la malaltia i un gran nombre d'autoantígens que també són diana en la diabetis tipus 1 humana<sup>196,197</sup>.

Tot i que les cèl·lules beta pancreàtiques són la principal diana de l'atac autoimmunitari en la T1D<sup>146</sup>, s'ha descrit la presència de limfòcits T i B autoreactius contra elements del sistema nerviós, que comparteixen antígens amb les cèl·lules beta pancreàtiques<sup>144,180</sup>. També s'ha observat que la resposta contra autoantígens neuronals apareix als estadis inicials de la malaltia, fet que suggereix que l'atac a les cèl·lules neuronals podria ser previ a l'atac a les cèl·lules beta pancreàtiques<sup>120</sup>.

Per altra banda, diversos estudis apunten que en la diabetis tipus 1 també hi podria haver una afectació neuronal, concretament en les neurones sensorials. Estudis realitzats per Dosch (Razavi *et al.* 2006) descriuen que les neurones sensorials TRPV1+ de ratolins NOD pateixen una disfunció que no els permet activar-se i alliberar els neuropèptids a les cèl·lules dels illots pancreàtics<sup>123</sup>. A més a més, el gen de TRPV1+ es troba en un dels *loci* de susceptibilitat a la malaltia en ratolins NOD<sup>123</sup>. Recentment, també s'han associat mutacions en el gen de TRPV1+ amb la susceptibilitat de patir la T1D en humans<sup>124</sup>.

Amb l'objectiu d'estudiar més a fons la implicació de les neurones sensorials en el desenvolupament de la diabetis tipus 1, es va realitzar l'estudi dels ganglis espinals. Els estudis histopatològics dels cossos neuronals de les cèl·lules sensorials van revelar la presència de vacúols al citoplasma d'algunes cèl·lules sensorials. Es va observar que aquesta afectació es mantenia constant a diferents edats (algunes cèl·lules mostraven una afectació menor a les dues setmanes de vida), i que era quelcom propi de la soca NOD i no relacionada amb la resposta autoreactiva dels limfòcits, ja que no s'observava la presència d'aquests vacúols en els ratolins de la soca C57BL/6, però sí en els de la soca NOD.RAG2-/-<sup>205</sup>. Els

estudis histopatològics també van confirmar que era un fenomen independent a l'expressió de periferina, i que no variava amb l'aparició de la diabetis.

Nombrosos estudis han relacionat l'acumulació de lisosomes i vacúols autofàgics al citoplasma cel·lular amb l'aparició de malalties neurodegeneratives, com ara l'Alzheimer<sup>217</sup>, el Parkinson<sup>218</sup>, la malaltia de Huntington<sup>219</sup> o l'esclerosi lateral amiotròfica<sup>220</sup>, entre d'altres<sup>221</sup>. En el cas de l'afectació observada en el ratolí NOD es descarta l'autofàgia, ja que els vacúols no presenten la doble membrana característica d'aquesta. L'afectació observada podria ser en l'àmbit de l'aparell de Golgi i/o un procés d'"excitotoxicitat", un procés patològic caracteritzat per la sobreactivació dels receptors del neurotransmissor excitador glutamat<sup>222</sup>. Una afectació semblant s'ha descrit en les cèl·lules dels ganglis raquidis del model en rata BB per a diabetis, on es postula que l'afectació seria causada per un deteriorament en la síntesi de les proteïnes del citoesquelet<sup>223</sup>. En el nostre cas encara no hem pogut determinar el fet causal o les molècules implicades en aquesta afectació en el ratolí NOD. Pensem analitzar-ho aviat a través d'estudis d'expressió de mRNA.

El paper que duen a terme les neurones sensorials i els neuropèptids en la diabetis tipus 1 és un tema en discussió, d'interès creixent i amb una dualitat difícil de comprendre amb els estudis realitzats fins al moment. Per una banda, s'ha descrit que l'administració exògena de Sp reverteix la insulinitis i retorna els valors de fisiològics de glicèmia durant un període de temps<sup>123</sup>. En aquest mateix sentit, s'ha vist que l'expressió transgènica del CGRP a les cèl·lules beta pancreàtiques redueix la incidència de la malaltia<sup>224</sup>. Per altra banda, s'ha descrit que aquests mateixos neuropèptids (CGRP i Sp) serien proinflamatoris i promotors de la mobilització del sistema immunitari<sup>225,226</sup>. A més a més, l'eliminació de les neurones sensorials mitjançant dosis altes de capsaicin o mitjançant una denervació mecànica també produeix una baixada de la incidència de la malaltia. Aquesta dualitat no és exclusiva de la diabetis, sinó que també s'ha descrit en models animals per a colitis ulcerosa. En estudis realitzats en aquests models s'ha vist que l'eliminació de les neurones TRPV1+ es tradueix en una millora de la malaltia, mentre que els animals knockouts per a aquest receptor (TRPV-/-) pateixen una exacerbació<sup>227</sup>. En estudis realitzats pel grup del Dr. Dosch en el model NOD se suggereix que amb l'eliminació de les neurones TRPV1+ permetria suprimir les interaccions patològiques amb els illots pancreàtics, de la mateixa manera que ho faria l'administració exògena de Sp<sup>123</sup>.

El conjunt d'aquests resultats indicaria la presència d'altres mecanismes implicats en l'alliberació i regulació dels neuropèptids, fet que podria explicar, en part, la manca d'efecte del pèptid DD04107 en els animals NOD i NOD.RAG2-/- . Aquest pèptid bloqueja la secrecció de CGRP resultant de l'activació TRPV1<sup>228</sup>. Tot i que

s'ha mostrat l'eficiència del pèptid *in vivo* en models d'inflamació i dolors crònics<sup>214</sup>, no ha resultat efectiu per prevenir la malaltia en el model NOD, ja que no s'observen diferències respecte al control.

En models de colitis ulcerosa s'ha descrit l'alliberació de Sp com a conseqüència de l'activació del receptor TRPA1, també present en les neurones TRPV1+<sup>229</sup>. Podria ser que en la T1D, igual que s'ha descrit en la colitis ulcerosa, altres receptors presents en les neurones TRPV1+ intervinguessin en la regulació dels neuropeptids, i per tant, la diana d'actuació del pèptid no fos l'adequada per modular l'alliberament de neurotransmisors.

El model NOD presenta degeneració d'algunes neurones sensorials, com s'ha vist en aquest treball, i una hipofunció de les neurones sensorials TRPV1+, descrita anteriorment pel grup del Dr. Dosch<sup>123</sup>. També s'ha observat una patologia semblant en les neurones sensorials del model de rata BB<sup>223</sup>. Aquests indicis apunten que hi podria haver una relació entre la degeneració neuronal i l'aparició de la T1D. No obstant això, encara es necessiten molts estudis per entendre la implicació d'aquest fenomen en el desenvolupament de la malaltia. Per una banda, hi ha la complexa relació que s'estableix entre el sistema nerviós i el sistema immunitari mitjançant l'acció dels neurotransmisors. Per altra, hi ha la possibilitat que l'afectació neuronal observada posi al descobert autoantígens que en condicions fisiològiques no serien visibles, la qual cosa afavoreix una resposta autoimmunitària en aquells individus susceptibles de patir la malaltia. Aquesta hipòtesi es basa en la resposta autoimmunitària contra antígens neuroendocrins que s'observa en la T1D, i en el fet que aquests antígens són diana en els estadis inicials de la malaltia<sup>144,180</sup>. N'és un exemple la presència de limfòcits reactius contra GFAP en animals abans de les 3 setmanes d'edat<sup>183</sup>.

Mitjançant l'enginyeria genètica s'han creat noves variacions del model NOD. Entre els nous models que deriven del fons genètic NOD, trobem models als quals se'ls ha inserit un gen mitjançant transgènesis, o en altres als quals s'ha anul·lat l'expressió, que és el que es coneix com a knockout.

La tècnica de knockout va ser desenvolupada a finals de la dècada dels 80 per Capecchi, Evans i Smithies, i els va fer mereixedors del premi Nobel de medicina el 2007. Aquesta tècnica es basa en la introducció d'un fragment de DNA mutat en una zona concreta del genoma mitjançant la recombinació homòloga del DNA, per obtenir gens no funcionals. En un primer estadi es crea la recombinació homòloga en cèl·lules mare embrionals, que a continuació es cultiven i se seleccionen. Finalment, s'implanten les cèl·lules embrionals modificades en l'úter d'un ratolí<sup>230</sup>. Des del moment del desenvolupament de la tècnica fins a l'actualitat, s'han estudiat més de 22.000 gens. Alguns han tingut un efecte letal per als animals;

altres, en canvi, només han causat petits canvis fenotípics als animals, fet que s'explica, en part, per la funció redundant de molts gens<sup>230</sup>.

Així doncs, amb l'objectiu d'estudiar el paper de la periferina en el decurs de la diabetis, es va introduir una mutació en el gen de la periferina en animals de fons genètic NOD mitjançant retrocreuament a partir d'un ratoli CD75BL/6.Per-/-<sup>212</sup>. En els animals fruit del creuament es va analitzar si eren portadors de la mutació mitjançant l'amplificació en cadena de la polimerasa (PCR) amb oligonucleòtids específics (*primers*). També es va comprovar la correcta supressió de l'expressió del gen mitjançant tincions d'immunofluorescència directa utilitzant un anticòs anti-periferina sobre talls de teixit pancreàtic dels "descendents" de la soca NOD.Per-/-.

En relació amb l'evolució de la diabetis, en el nou model knockout de periferina s'observa una evolució més lenta respecte al model NOD en els estadis inicials de la malaltia, quan comença la infiltració als illots pancreàtics. Quan es compara l'evolució de la malaltia amb la soca NOD, també s'observa un endarreriment en l'aparició de la malaltia. No obstant això, la incidència final és semblant en ambdues soques.

En aquest sentit, el paper de la periferina és com el de l'autoantigen neuroendocrí IGRP. En diversos estudis centrats en el paper de IGRP com a autoantigen en el decurs de la diabetis, s'ha descrit una important resposta en estadis inicials de la malaltia, però tot i això l'absència d'aquest autoantigen no és suficient per aturar l'aparició de la malaltia<sup>231</sup>. Igual que en el cas de l'IGRP, s'hauria de descartar la resposta contra periferina com a desencadenant de la diabetis tipus 1. Tanmateix, és probable el desencadenant de la diabetis no sigui un únic antigen diana.

A més de la T1D, s'ha descrit la implicació de la periferina en l'etiopatogenia de l'esclerosi lateral amiotròfica, a través de la formació d'agregats insolubles d'aquesta proteïna en el citoplasma de les motoneurons, fet que n'indueix la neurodegeneració d'aquestes<sup>232</sup>. En la patologia de l'esclerosi lateral amiotròfica, la periferina no seria reconeguda com a autoantigen, sinó com a causant de l'afectació a les motoneurons com a conseqüència de la formació d'agregats. Respecte al rol de la periferina en el desenvolupament de la diabetis, cal destacar que el gen de la periferina no es troba dintre dels *loci* de susceptibilitat a la malaltia (resultats no mostrats en aquest treball).

Després d'estudiar el rol de la periferina com a autoantigen en el decurs de la diabetis, i el paper de la periferina com a proteïna relacionada en la degeneració neuronal en el model NOD, es va estudiar en profunditat la resposta dels limfòcits B contra aquesta proteïna.

Estudis previs realitzats pel nostre grup van identificar la presència de limfòcits B amb especificitat contra la perifèria en l'infiltrat leucocitari present als illots pancreàtics de ratolí NOD. Vam observar també que aquests limfòcits B anti-perifèria eren seleccionats positivament en el decurs de la malaltia<sup>208,209</sup>. Recentment, estudis del grup del Dr. Stratmann (Garabatos *et al.* 2014) han detectat la presència de limfòcits B autorreactius contra la perifèria en el model NOD a edats joves, i han descrit un increment d'aquests limfòcits a mesura que avança la T1D<sup>216</sup>. Finalment, també s'ha descrit la presència d'autoanticossos reactius contra perifèria en sèrums pacients diabètics<sup>210</sup>. La suma de tots aquests resultats apuntava que la resposta contra la perifèria portada a terme pels limfòcits B tenia una rellevància especial en el desenvolupament de la diabetis tipus 1. És per això que es van generar dos nous models transgènics que expressen un BCR transgènic que reconeix la perifèria. Com a resultat de l'estudi de l'especificitat antigènica dels limfòcits B, realitzat prèviament en al nostre laboratori, es van obtenir una gran quantitat d'hibridomes. Es va seleccionar un dels hibridomes que reconeixia perifèria, l'H280, que presentava canvi d'isotip i maduració de l'afinitat cap a la perifèria. El limfòcit B a partir del qual es va generar aquest hibridoma procedia, a més a més, de l'infiltrat d'un illot d'una femella diabètica. A partir de la seqüència de la regió variable d'aquest BCR es van crear els models transgènics 280.IgH.NOD i 280.IgH.IgL.NOD. En el primer model només s'expressa la cadena pesada de la immunoglobulina; en canvi, en el segon model s'expressa el BCR transgènic complet. En el model 280.IgH.NOD cal destacar que l'expressió de la cadena pesada suposa un increment en el nombre de precursors de limfòcits B que reconeixen la perifèria, però, no obstant això, la reordenació de la cadena lleugera permet a aquests limfòcits reconèixer altres antígens. Després d'analitzar la correcta expressió del transgen IgM i IgD en els limfòcits B dels nous models, es va observar que els dos models transgènics presenten una forma accelerada de la malaltia i amb major incidència que la soca NOD. Els animals portadors del BCR transgènic complet, els 280.IgH.IgL.NOD, són els que presenten un desenvolupament més accelerat de la malaltia, amb un debut en edats més joves i amb una incidència del 100% en els casos estudiats fins a dia d'avui.

Estudis de la incidència de la malaltia realitzats en el model 280.IgH.NOD.Per-/-, model que combina l'expressió de la cadena pesada del BCR amb la supressió de la perifèria, demostrarien l'especificitat antigènica del receptor del BCR. En aquest model la incidència de la malaltia és semblant a la que es produeix en els ratolins NOD. Això demostraria que l'acceleració de la malaltia que s'observa en la soca 280.IgH.NOD és conseqüència de l'acció dels limfòcits B contra la perifèria, ja que quan no hi ha presència de l'autoantigen diana la malaltia segueix la mateixa evolució que el model NOD. Aquests resultats contrasten amb els resultats



obtinguts amb altres models animals en què els limfòcits B expressen un BCR transgènic, a on, en la majoria de casos, es troben els limfòcits B en estat anèrgic<sup>110</sup>.

El primer model generat per a l'estudi dels limfòcits B en la diabetis va ser el NOD.IgHEL, que expressa un receptor de BCR transgènic que reconeix la proteïna lisozim de l'ou de la gallina o HEL, una proteïna irrellevant per al desenvolupament de la diabetis<sup>108</sup>. En aquest model s'observa un endarreriment en el debut de la malaltia, però una incidència acumulada semblant. Un altre model animal que va permetre l'estudi del paper dels limfòcits B va ser el model animal NOD.IgM<sup>null</sup>, en aquest model que no presenta limfòcits B madurs a la perifèria i en el qual no es detecta pràcticament diabetis clínica<sup>149</sup>. Aquest mateix fenomen s'observa en un tercer model resultant de la combinació dels dos anteriors. L'animal NOD.IgHEL.IgM<sup>null</sup> no pot reordenar els gens de les immunoglobulines endògenes i, per tant, només expressa el BCR transgènic a la seva superfície<sup>149,108</sup>. Aquest model tampoc desenvolupa T1D, això indica que l'especificitat antigènica dels limfòcits B és important per al desenvolupament de la T1D.

En la literatura només trobem un altre model de BCR transgènic que mostra un increment de la malaltia en models NOD. Es tracta del transgènic per cadena pesada 125TG, que expressa un BCR transgènic que reconeix la insulina. Tot i això, i a diferència del model 280.IgH.IgL.NOD, només mostra un lleuger increment de la diabetis quan expressa només la cadena pesada de forma transgènica i, per tant, amb llibertat per reordenar la cadena lleugera de forma endògena. En canvi, i a diferència del nostre model (280.IgH.IgL.NOD), quan expressa el BCR transgènic, tant per cadena pesada com per cadena lleugera, la incidència es troba per sota de la dels seus germans de camada no transgènics<sup>109</sup>. Aquest fet corroboraria la importància de la resposta anti-periferina en el decurs del desenvolupament de la T1D, fins i tot davant d'un autoantigen tan rellevant com la insulina.

Un altre model que mereix atenció és el 116C-NOD. Aquest model va ser generat al nostre laboratori i presenta el BCR transgènic que reconeix una proteïna expressada en illots pancreàtics (pendent d'identificació). Igual que el model 280.IgH.IgL.NOD, la seqüència del BCR va ser clonada d'un dels hibridomes resultants de l'estudi d'especificitat antigènica dels limfòcits B. A diferència però dels dos models generats a partir de l'hibridoma H280, aquest model presenta una disminució de la incidència de la malaltia<sup>233</sup>. En el model 116C-NOD, igual que en el model 125TG<sup>109</sup>, s'ha descrit un augment dels limfòcits B madurs de la zona marginal, una deleció clonal en l'àmbit de la tolerància central, i els pocs limfòcits B que arriben a madurar es troben en estat anèrgic, incapaços de respondre quan són estimulats a través del BCR.

És important destacar que, tot i l'acceleració de la malaltia, en els models animals 280.IgH.NOD i 280.IgH.IgL.NOD també s'ha vist augmentada la població de

limfòcits B madurs de la zona marginal, i en estudis realitzats *in vitro* amb limfòcits B de la soca 280.IgH.NOD també se n'ha descrit la no activació a través del BCR. Igual que en el ratolí 116C-NOD<sup>233</sup>, els limfòcits B del model 280.IgH.NOD poden respondre quan són estimulats amb LPS i CD40 amb IL-4, en canvi no proliferen quan reben l'estímul a través del seu BCR, ja sigui mitjançant un anticòs anti-BCR o en contacte amb periferina. En la literatura s'ha descrit la capacitat dels limfòcits T col·laboradors d'activar cèl·lules anèrgiques quan reben estímul a través del BCR. No obstant això, en els experiments realitzats no vam observar diferències proliferatives entre els limfòcits B sortejats o els que van ser cultivats juntament amb limfòcits T.

En la majoria dels models transgènics per limfòcits B descrits en la literatura, aquests mostren un estat anèrgic que els impedeix proliferar quan són estimulats. Principalment, mostren incapacitat per proliferar quan reben l'estímul a través del BCR<sup>111</sup>. La manca de proliferació ve acompanyada d'una baixada d'expressió en les molècules de BCR, tret característic dels limfòcits B anèrgics<sup>96</sup>. En canvi, en el model 280.IgH.NOD s'observa un lleuger increment de les molècules de IgM respecte als seus germans de camada no transgènics, i un increment encara més accentuat quan es comparen els nivells de IgM en els limfòcits B que es troben infiltrant els illots pancreàtics. En el model 280.IgH.IgL.NOD l'increment de la IgM encara és més acusat en els dos casos, tant en els limfòcits B procedents de la melsa com en els limfòcits B procedents de l'infiltrat pancreàtic. D'altra banda, s'ha descrit que els limfòcits B anèrgics no presenten canvis en l'expressió de la IgD, i en molts casos l'expressió de IgD és superior a l'expressió de IgM<sup>234</sup>. En canvi, en els models animals generats a partir de l'hibridoma 280, s'observa una reducció dels nivells de IgD en els limfòcits B presents a la melsa, típic dels limfòcits B activats per l'antigen<sup>235</sup>, però, en canvi, s'observa un increment d'expressió d'aquesta molècula en els limfòcits B que es troben infiltrant els illots.

En el cas dels limfòcits B infiltrants als illots pancreàtics, aquests presenten un fenotip semblant al de les cèl·lules transicionals de tipus 1<sup>12</sup> i un perfil de proliferació diferent al dels limfòcits B procedents de melsa. Quan els limfòcits B procedents de l'infiltrat reben l'estímul a través del BCR, aquests s'activen i proliferen. El conjunt d'aquests resultats, juntament amb els nivells d'expressió del BCR en els models transgènics i en el model NOD, indicarien que la població de limfòcits B infiltrants no és una població de limfòcits B anèrgics.

Així, en una primera instància, els resultats observats podrien indicar que els limfòcits B infiltrants es troben en un nivell superior d'activació que els de melsa, ja que en rebre un estímul a través del seu BCR aquests poden proliferar. Aquesta característica podria estar relacionada amb la funció efectora que podrien dur a terme als illots pancreàtics<sup>166</sup>.

Si centrem l'atenció en el fenotip que adopten els limfòcits B després de rebre l'estímul a través del BCR observarem diferències notòries. En el cas dels limfòcits B procedents de melsa, aquests adopten un fenotip de limfòcits fol·liculars (amb presència dels marcadors CD21 i CD23 a la seva superfície)<sup>1</sup>. En canvi, els limfòcits B que infiltren els illots presenten un fenotip semblant al de limfòcits B transicionals de tipus 1<sup>12</sup>, és a dir, sense presència dels marcadors CD21 i CD23 a la superfície cel·lular, tant abans com després de l'estimulació a través del BCR. En aquest sentit, per tant, podria ser que les diferències fenotípiques observades fossin conseqüència de les diferències en l'estat d'activació dels limfòcits. Amb tot, no s'hauria de descartar la possibilitat que els limfòcits B infiltrants pertanyessin a una nova població amb característiques efectores encara no descrita a la literatura, o provinguessin d'altres orígens no esplènics, com podria ser la cavitat peritoneal.

Recentment s'ha descrit que els limfòcits B1 presents a la cavitat peritoneal tenen la capacitat de fagocitar antígens, amb major eficiència en presència de IgM al medi o a la membrana, fet que les permet que actuïn com a cèl·lules presentadores d'antigen i activar els limfòcits T CD4. Aquestes cèl·lules poden captar antígens presents en el medi en poca quantitat i presentar-los, de manera que activarien de manera més eficient els limfòcits T CD4, que reconguin aquests antígens, que les cèl·lules dendrítiques<sup>164</sup>.

Estudis realitzats pel grup del Dr Stratmann han descrit un elevat nombre de limfòcits B anti-periferina presents a la cavitat peritoneal en els ratolins NOD<sup>216</sup>. A més, estudis on es delectaven els limfòcits de la cavitat peritoneal mitjançant un xoc hipotònic han mostrat una evolució més lenta de la T1D<sup>236</sup>. El conjunt d'aquests estudis han posat de manifest la rellevància de les cèl·lules B1 de la cavitat peritoneal en el desenvolupament de la malaltia. També s'ha descrit la importància de les cèl·lules B1 en altres malalties autoimmunitàries, principalment el lupus eritematós sistèmic<sup>237</sup>. Així, s'ha descrit la mort de les cèl·lules B1 presents a la cavitat peritoneal quan els BCR reconeixen un antigen amb alta afinitat en soques resistents de models de LES, però no en soques susceptibles a aquesta malaltia autoimmunitària<sup>238</sup>. Igual que els estudis anteriors, aquests semblen contradir els resultats observats en els models 280.IgH.NOD i 280.IgH.IgL.NOD, ja que tots dos models s'observa una reducció gairebé total dels limfòcits B1 de la cavitat peritoneal, però en canvi la malaltia es troba accelerada en ambdues soques.

Malgrat això, cal destacar la diferència de model de malaltia, ja que en el que citem els estudis van ser realitzats en un model de lupus<sup>238</sup>, mentre que els nostres treballs han estat realitzats en un model de diabetis. Podria ser que el mecanisme que activa l'eliminació dels limfòcits B1 quan reconeixen un antigen amb alta afinitat no es trobés alterat en la mateixa mesura en el model NOD, tot i ser una

soca susceptible a l'autoimmunitat. Malgrat la reducció dràstica de la població de B1 a la cavitat peritoneal que s'observa en els models 280.IgH.NOD i 280.IgH.IgL.NOD, podria ser que les poques cèl·lules B1 remenents, amb especificitat contra la periferina, tinguessin la capacitat d'accelerar la diabetis. Estudis preliminars realitzats en animals de la soca 280.IgH.NOD.Per-/-, no mostrats en aquest treball, indicarien que en absència de l'antigen (periferina) es produeix una restauració de la població de limfòcits B1 presents en la cavitat peritoneal.

En el model 116C-NOD també s'observa una reducció de la població de limfòcits B1 presents a la cavitat peritoneal, però a diferència dels transgènics descrits en aquesta memòria s'observa una evolució molt diferent de la malaltia<sup>233</sup>. Com ja s'ha comentat, estudis no publicats realitzats pel nostre grup han mostrat diferències significatives en els nivells d'expressió de la IgM dels limfòcits B1 entre el model 116C-NOD i els models 280.IgH.NOD i 280.IgH.IgL.NOD. Així, en el model 116C-NOD s'observa la disminució de l'expressió en un ordre de magnitud de la IgM en les cèl·lules B1 de la cavitat peritoneal amb comparació a les mateixes de la soca NOD(resultats no publicats). Altrament, en el model 280.IgH.NOD s'observa un increment d'expressió de l'IgM en limfòcits B1 en un ordre de magnitud respecte a la soca NOD. Les diferents expressions de IgM en aquestes tres soques correlacionen amb tres manifestacions diferents de la malaltia, de manera que l'expressió més gran de molècules IgM autoreactives a les cèl·lules B1 peritoneals podria estar relacionada amb un increment de la malaltia. Tanmateix, en el model 280.IgH.IgL.NOD els valors d'expressió d'IgM en la superfície de les cèl·lules B1 són semblants a les B1 cèl·lules procedents de la soca NOD. Aquests resultats sorprenen una mica si tenim en compte l'acceleració dramàtica de la malaltia que pateixen els ratolins 280.IgH.IgL.NOD. Tot i així, hem de tenir en consideració que els valors d'expressió són equivalents als del NOD. Per tant, en el model 280.IgH.IgL.NOD podria ser que tot i tenir una expressió semblant d'IgM a la seva superfície, la major especificitat del seu BCR cap a la periferina permetés als limfòcits B captar la periferina i presentar-la d'una forma més eficient.

Nombrosos estudis han apuntat que el paper dels limfòcits B en el decurs de la diabetis es produiria mitjançant la seva actuació com a cèl·lules presentadores d'antigen<sup>239,108</sup>. Per tot això, no seria estrany que les cèl·lules B1 de la cavitat peritoneal, cèl·lules amb gran capacitat presentadora d'antígens, infiltrassin els illots i presentessin els autoantígens als limfòcits T<sup>164</sup>. A més, les cèl·lules B1 presenten un fenotip semblant al de les cèl·lules B que es troben infiltrant els illots pancreàtics<sup>66</sup>. Actualment, s'estan portant a terme estudis que ens ajudaran a determinar l'origen de les cèl·lules B que es troben infiltrant els illots pancreàtics.

Com s'ha comentat anteriorment, la funció dels limfòcits B en el decurs de la diabetis seria com a cèl·lules presentadores d'antigen<sup>239</sup>. Estudis realitzats en els models NOD IgM<sup>Null</sup> i NOD.IgHEL.IgM<sup>null149,108</sup> evidencien que la manca de limfòcits B amb BCR autorreactius enredarreix de manera notòria l'aparició de la malaltia. Per altra banda, altres estudis han descrit que l'increment de molècules coestimuladores a la superfície dels limfòcits B infiltrants als illots pancreàtics<sup>240</sup> podria estar relacionada amb l'aparició de la malaltia. El conjunt d'aquests estudis suporta la hipòtesi del rol dels limfòcits B com a APCs *in situ* en el decurs de la T1D<sup>108</sup>.

En estudis previs realitzats al nostre laboratori en el model NOD, es va descriure un increment de molècules coestimuladores i de MHC en els limfòcits B infiltrants als illots<sup>240</sup>. En els estudis presentats en la present memòria s'han reproduït els increments de molècules MHC de classe I i de classe II, però no per a la molècula CD86 en ratolins NOD. Cal esmentar que els animals utilitzats en els dos experiments havien estat sotmesos a condicions d'estabulació diferents. Per tant, de la mateixa manera que els canvis d'estabulació influeixen l'evolució de la malaltia, també poden influir en l'expressió de les molècules.

És important destacar que en el model 280.IgH.IgL.NOD, el model que presenta una forma més accelerada la malaltia, s'ha observat un increment en l'expressió de molècules coestimuladores més pronunciat en els limfòcits B procedents dels illots que no pas en els que procedeixen de la melsa.

Respecte a les molècules coestimuladores, resulta també molt interessant destacar els canvis d'expressió que existeixen entre limfòcits B procedents de melsa de la soca NOD i els procedents de la soca 280.IgH.NOD quan es troben sotmesos a diferents estímuls. On s'observen més diferències és en els limfòcits B que han estat estimulats a través del BCR, que també pateixen més diferències a nivell proliferatiu. Els limfòcits B procedents de la melsa de la soca 280.IgH.NOD, després de l'estimulació a través del BCR, incrementen l'expressió de CD86. Aquest increment també s'observa en els limfòcits B procedents de la soca NOD, però en el cas dels limfòcits B transgènics l'increment encara és més pronunciat. Juntament amb l'augment de l'expressió de CD86 trobem un increment d'expressió de molècules CD80 i MHC de classe II, totes tres molècules rellevants en la funció efectora d'una cèl·lula presentadora d'antigen.

Estudis idèntics realitzats en el model 116C-NOD han mostrat que quan els limfòcits B transgènics procedents de melsa són estimulats a través del BCR el nivell d'expressió de CD86 és més baix que el presentat pels limfòcits B de germans de camada no transgènics<sup>233</sup>. Per altra banda, estudis realitzats amb el model murí B7-2KO, una variació del model NOD, a la qual s'ha suprimit

l'expressió de la molècula B7-2 (CD86), van mostrar que aquests animals no desenvolupen la diabetis<sup>204</sup>.

El conjunt d'aquests resultats apuntaria al fet que els limfòcits B transgènics de la soca 280.IgH.NOD podrien accelerar la malaltia actuant com a cèl·lules presentadores d'antigen *in situ*, ja que mostren elevats nivells de molècules coestimuladores i també de molècules MHC. En canvi, els limfòcits B procedents del model transgènic 116C-NOD no podrien actuar com a APCs de manera eficient a causa d'una manca de senyalització de les molècules coestimuladores, fet que es veuria reflectit en un descens de la malaltia.

Per acabar, cal destacar la polineuropatia observada en el model B7-2KO<sup>204</sup>. Aquests animals tot i que no presenten diabetis, mostren una polineuropatia com a conseqüència de l'atac autoimmunitari, amb afectació als nervis perifèrics i inflamació i infiltració leucocitària dels ganglis raquidis. Així doncs, els resultats observats en aquest model anirien en concordança amb els resultats presentats en aquest treball. Així, la neurodegeneració d'algunes neurones sensorials, juntament amb defectes de la tolerància propis de l'individu, afavoririen un primer atac autoimmunitari contra les neurones que innerven els illots pancreàtics. Posteriorment, i mitjançant l'acció de cèl·lules APCs, amb una importància especial de l'acció portada a terme *in situ* pels limfòcits B, podrien presentar altres autoantígens, entre els quals hi hauria autoantígens compartits amb les cèl·lules beta pancreàtiques, i desencadenar un segon atac autoimmunitari, aquesta vegada dirigit també contra de les cèl·lules beta.



## VIII- CONCLUSIONS





Conclusions

- 1- La periferina és un autoantigen reconegut des de les primeres etapes de la resposta autoreactiva de la diabetis tipus 1 en el ratolí NOD. Tot i això, en la seva absència la diabetis es desenvolupa indicant que no és un antigen essencial pel desenvolupament de la diabetis.
- 2- Neurones sensorials dels GR dels ratolins NOD pateixen una degeneració caracteritzada per la formació de vacúols al seu citoplasma compatible amb l'existència d'una alteració en l'aparell de Golgi. Aquest fet suggereix que els ratolins NOD pateixen un trastorn neurodegeneratiu.
- 3- La neurodegeneració observada en les neurones dels ganglis espinals en els ratolins NOD a edats joves indica una afectació neuronal prèvia al debut de la insulitis en els ratolins NOD
- 4- Tot i que la periferina no és un antigen essencial pel desenvolupament de la diabetis, la resposta portada a terme pels limfòcits B contra aquest autoantigen accelera el desenvolupament de la malaltia en els nous models 280.IgH.NOD i 280.IgH.IgL.NOD.
- 5- En els models animals 280.IgH.NOD i 280.IgH.IgL.NOD hi ha un augment significatiu de limfòcits B de zona Marginal, acompanyat d'un descens de limfòcits fol·liculars i limfòcits B1 de la cavitat peritoneal.
- 6- Els limfòcits B de melsa de la soca 280.IgH.NOD expressen nivells elevats d'IgM i nivells baixos d'IgD a la seva superfície cel·lular i no proliferen a l'estimulació a través del BCR.
- 7- L'estimulació a través del BCR indueix un increment important d'expressió de la molècula CD86 en els limfòcits B de melsa dels ratolins 280.IgH.NOD
- 8- Els limfòcits B presents a l'infiltrat insular de la soca 280.IgH.NOD es caracteritzen per expressar nivells elevats d'IgM i d'IgD i respondre a estímuls rebuts a través del BCR en presència de limfòcits T.
- 9- L'increment observat de molècules coestimuladores i de MHC de classe I i II suggereix que els limfòcits B infiltrants als illots de la soca 280.IgH.IgL.NOD poden, després de l'estimulació a través del BCR, actuar com a cèl·lules presentadores d'antigen i activar els limfòcits T autoreactius contra periferina.



## IX- BIBLIOGRAFIA



1. Pieper, K., Grimbacher, B. & Eibel, H. B-cell biology and development. *J. Allergy Clin. Immunol.* **131**, 959–71 (2013).
2. Hardy, R. R. & Hayakawa, K. B Cell Development Pathways. *Annu. Rev. Immunol.* **19**, 595–621 (2001).
3. Kondo, M., Weissman, I. L. & Akashi, K. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* **91**, 661–72 (1997).
4. Rolink, a *et al.* A subpopulation of B220+ cells in murine bone marrow does not express CD19 and contains natural killer cell progenitors. *J. Exp. Med.* **183**, 187–94 (1996).
5. Panaroni, C. & Wu, J. Y. Interactions between B lymphocytes and the osteoblast lineage in bone marrow. *Calcif. Tissue Int.* **93**, 261–8 (2013).
6. Almqvist, N. & Mårtensson, I.-L. The pre-B cell receptor; selecting for or against autoreactivity. *Scand. J. Immunol.* **76**, 256–62 (2012).
7. J Hombach, T Tsubata, L Leclercq, H Stappert, M. R. Molecular components of the B-cell antigen receptor complex of the IgM. *Nature* **343**, 760–762 (1990).
8. Melchers, F. The pre-B-cell receptor: selector of fitting immunoglobulin heavy chains for the B-cell repertoire. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 578–584 (2005).
9. Niirö, H. & Clark, E. a. Regulation of B-cell fate by antigen-receptor signals. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 945–56 (2002).
10. Brady, B. L., Steinel, N. C. & Bassing, C. H. Antigen receptor allelic exclusion: an update and reappraisal. *J. Immunol.* **185**, 3801–8 (2010).
11. Miosge, L. a & Goodnow, C. C. Genes, pathways and checkpoints in lymphocyte development and homeostasis. *Immunol. Cell Biol.* **83**, 318–35 (2005).
12. Chung, J. B., Silverman, M. & Monroe, J. G. Transitional B cells: step by step towards immune competence. *Trends Immunol.* **24**, 342–348 (2003).
13. Merrell, K. T. *et al.* Identification of anergic B cells within a wild-type repertoire. *Immunity* **25**, 953–62 (2006).
14. Mackay, F., Figgett, W. a, Saulep, D., Lepage, M. & Hibbs, M. L. B-cell stage and context-dependent requirements for survival signals from BAFF and the B-cell receptor. *Immunol. Rev.* **237**, 205–25 (2010).
15. Cancro, M. P. Signalling crosstalk in B cells: managing worth and need. **9**, 657–661 (2009).
16. Schneider, P. *et al.* Maturation of marginal zone and follicular B cells requires B cell activating factor of the tumor necrosis factor family and is independent of B cell maturation antigen. *J. Exp. Med.* **194**, 1691–7 (2001).
17. Schneider, F. M. & P. Cracking the BAFF code. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 491–502 (2009).
18. Carsetti, R., Rosado, M. M. & Wardmann, H. Peripheral development of B cells in mouse and man. *Immunol. Rev.* **197**, 179–91 (2004).
19. Cherukuri, a., Cheng, P. C. & Pierce, S. K. The Role of the CD19/CD21 Complex in B Cell Processing and Presentation of Complement-Tagged Antigens. *J. Immunol.* **167**, 163–172 (2001).
20. Nitschke, L., Carsetti, R., Ocker, B., Köhler, G. & Lamers, M. C. CD22 is a negative regulator of B-cell receptor signalling. *Curr. Biol.* **7**, 133–43 (1997).
21. Harwood, N. E. & Batista, F. D. Early events in B cell activation. *Annu. Rev. Immunol.* **28**, 185–210 (2010).
22. Schreiner, G., Braun, J. & Unanue, E. Spontaneous redistribution of surface immunoglobulin in the motile B lymphocyte. *J. Exp. ...* **144**, 1683–1688 (1976).
23. Defrance, T., Taillardet, M. & Genestier, L. T cell-independent B cell memory. *Curr. Opin. Immunol.* **23**, 330–6 (2011).
24. Avalos, A. M. & Ploegh, H. L. Early BCR Events and Antigen Capture, Processing, and Loading on MHC Class II on B Cells. *Front. Immunol.* **5**, 92 (2014).
25. Gatto, D. & Brink, R. The germinal center reaction. *J. Allergy Clin. Immunol.* **126**, 898–907 (2010).
26. Pape, K. a, Catron, D. M., Itano, A. a & Jenkins, M. K. The humoral immune response is initiated in lymph nodes by B cells that acquire soluble antigen directly in the follicles. *Immunity* **26**, 491–502 (2007).
27. Wykes, M., Pombo, a, Jenkins, C. & MacPherson, G. G. Dendritic cells interact directly with naive B lymphocytes to transfer antigen and initiate class switching in a primary T-dependent response. *J. Immunol.* **161**, 1313–9 (1998).
28. Mandel TE, Phipps RP, Abbot A, T. J. The follicular dendritic cell: long term antigen retention during immunity. *Immunol Rev.* **53**, 29–59 (1980).

29. Koppel, E. a *et al.* Specific ICAM-3 grabbing nonintegrin-related 1 (SIGNR1) expressed by marginal zone macrophages is essential for defense against pulmonary *Streptococcus pneumoniae* infection. *Eur. J. Immunol.* **35**, 2962–9 (2005).
30. Kurosaki, T. & Hikida, M. Tyrosine kinases and their substrates in B lymphocytes. *Immunol. Rev.* **228**, 132–48 (2009).
31. Lee, W.-Y. & Tolar, P. Activation of the B cell receptor leads to increased membrane proximity of the Igα cytoplasmic domain. *PLoS One* **8**, e79148 (2013).
32. McHeyzer-Williams, L. J. & McHeyzer-Williams, M. G. Antigen-specific memory B cell development. *Annu. Rev. Immunol.* **23**, 487–513 (2005).
33. Karin Reif<sup>1</sup>, 2, Eric H. Ekland<sup>1</sup>, 2, Lars Ohl<sup>3</sup>, Hideki Nakano<sup>4</sup>, Martin Lipp<sup>5</sup>, R. F. & J. G. C. Balanced responsiveness to chemoattractants from adjacent zones determines B-cell position. *Nature* **416**, 94–99 (2002).
34. Vinuesa, C. G. & Cyster, J. G. How T cells earn the follicular rite of passage. *Immunity* **35**, 671–80 (2011).
35. Foy TM<sup>1</sup>, Laman JD, Ledbetter JA, Aruffo A, Claassen E, N. R. gp39-CD40 interactions are essential for germinal center formation and the development of B cell memory. *J Exp Med* **180**, 157–63 (1994).
36. Barr, T. a, Gray, M. & Gray, D. B cells: programmers of CD4 T cell responses. *Infect. Disord. Drug Targets* **12**, 222–31 (2012).
37. Katja Lühje, Axel Kallies, Yoko Shimohakamada, Gabrielle T Belz, Amanda Light, D. M. T. & S. L. N. The development and fate of follicular helper T cells defined by an IL-21 reporter mouse. *Nat. Immunol.* **13**, 491–498 (2012).
38. Aguzzi, A., Kranich, J. & Krautler, N. J. Follicular dendritic cells: origin, phenotype, and function in health and disease. *Trends Immunol.* **35**, 105–13 (2014).
39. Aguzzi, A., Kranich, J. & Krautler, N. J. Follicular dendritic cells: origin, phenotype, and function in health and disease. *Trends Immunol.* **35**, 105–13 (2014).
40. Michael G. McHeyzer-Williams, G. J. V. N. & P. A. L. Molecular characterization of single memory B cells. *Nature* **350**, 502–505 (1991).
41. Hamel, K. M., Liarski, V. M. & Clark, M. R. Germinal center B-cells. *Autoimmunity* **45**, 333–47 (2012).
42. Millikin, P. Anatomy of germinal centers in human lymphoid tissue. *Arch Pathol.* **82**, 499–505 (1996).
43. Cyster, J. G. *et al.* Follicular stromal cells and lymphocyte homing to follicles. *Immunol. Rev.* **176**, 181–93 (2000).
44. Tellier, J. & Nutt, S. L. The unique features of follicular T cell subsets. *Cell. Mol. Life Sci.* **70**, 4771–84 (2013).
45. Cerutti, A., Puga, I. & Cols, M. Innate control of B cell responses. *Trends Immunol.* **32**, 202–11 (2011).
46. Rogozin, I. & Diaz, M. Cutting edge: DGYW/WRCH is a better predictor of mutability at G: C bases in Ig hypermutation than the widely accepted RGYW/WRCY motif and probably reflects a. *J. Immunol.* **172**, 26–29 (2004).
47. Liu, M. & Schatz, D. G. Balancing AID and DNA repair during somatic hypermutation. *Trends Immunol.* **30**, 173–81 (2009).
48. Keim, C., Kazadi, D., Rothschild, G. & Basu, U. Regulation of AID, the B-cell genome mutator. *Genes Dev.* **27**, 1–17 (2013).
49. Neuberger, M. S. & Rada, C. Somatic hypermutation: activation-induced deaminase for C/G followed by polymerase eta for A/T. *J. Exp. Med.* **204**, 7–10 (2007).
50. Delbos, F., Aoufouchi, S., Faili, A., Weill, J.-C. & Reynaud, C.-A. DNA polymerase η is the sole contributor of A/T modifications during immunoglobulin gene hypermutation in the mouse. *J. Exp. Med.* **204**, 17–23 (2007).
51. Allen, C. D. C., Okada, T., Tang, H. L. & Cyster, J. G. Imaging of germinal center selection events during affinity maturation. *Science* **315**, 528–31 (2007).
52. Vikstrom, I. & Tarlinton, D. M. B cell memory and the role of apoptosis in its formation. *Mol. Immunol.* **48**, 1301–6 (2011).
53. Edry, E. & Melamed, D. Class switch recombination: a friend and a foe. *Clin. Immunol.* **123**, 244–51 (2007).
54. Singh, K., Chang, C. & Gershwin, M. E. IgA deficiency and autoimmunity. *Autoimmun. Rev.* **13**, 163–77 (2014).
55. Geisberger, R., Lamers, M. & Achatz, G. The riddle of the dual expression of IgM and IgD. *Immunology* **118**, 429–37 (2006).

56. Gauchat, J. & Lebman, D. Structure and expression of germline epsilon transcripts in human B cells induced by interleukin 4 to switch to IgE production. *J. ...* **172**, 463–473 (1990).
57. Litinskiy MB1, Nardelli B, Hilbert DM, He B, Schaffer A, Casali P, C. A. DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BLyS and APRIL. *Nat. Immunol.* **9**, 822–9 (2002).
58. Fairfax, K. a, Kallies, A., Nutt, S. L. & Tarlinton, D. M. Plasma cell development: from B-cell subsets to long-term survival niches. *Semin. Immunol.* **20**, 49–58 (2008).
59. Oracki, S. a, Walker, J. a, Hibbs, M. L., Corcoran, L. M. & Tarlinton, D. M. Plasma cell development and survival. *Immunol. Rev.* **237**, 140–59 (2010).
60. Hargreaves DC, Hyman PL, Lu TT, Ngo VN, Bidgol A, S. G. A coordinated change in chemokine responsiveness guides plasma cell movements. *J Exp Med* **194**, 45–56 (2001).
61. Balázs, M., Martin, F., Zhou, T. & Kearney, J. Blood dendritic cells interact with splenic marginal zone B cells to initiate T-independent immune responses. *Immunity* **17**, 341–352 (2002).
62. Vos, Q., Lees, a, Wu, Z. Q., Snapper, C. M. & Mond, J. J. B-cell activation by T-cell-independent type 2 antigens as an integral part of the humoral immune response to pathogenic microorganisms. *Immunol. Rev.* **176**, 154–70 (2000).
63. Woodruff MF, Reid B, J. K. Effect of antilymphocytic antibody and antibody fragments on human lymphocytes in vitro. *Nature* **215**, 591–4 (1967).
64. Egest J. Pone, Zhenming Xu, Clayton A. White, Hong Zan, and P. C. B cell Toll-like receptors and immunoglobulin class-switch DNA recombination. *Front Biosci* **17**, 2594–2615 (2014).
65. Ferguson, A. R., Youd, M. E. & Corley, R. B. Marginal zone B cells transport and deposit IgM-containing immune complexes onto follicular dendritic cells. *Int. Immunol.* **16**, 1411–22 (2004).
66. Montecino-Rodriguez, E. & Dorshkind, K. New perspectives in B-1 B cell development and function. *Trends Immunol.* **27**, 428–33 (2006).
67. Boes, M. Role of natural and immune IgM antibodies in immune responses. *Mol. Immunol.* **37**, 1141–9 (2000).
68. Kroese FG1, Ammerlaan WA, D. G. Location and function of B-cell lineages. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **4**, 44–58 (1992).
69. Chesneau, M., Michel, L., Degauque, N. & Brouard, S. Regulatory B Cells and Tolerance in Transplantation: From Animal Models to Human. *Front. Immunol.* **4**, 497 (2013).
70. Li, X., Braun, J. & Wei, B. Regulatory B cells in autoimmune diseases and mucosal immune homeostasis. *Autoimmunity* **44**, 58–68 (2011).
71. Kalampokis, I., Yoshizaki, A. & Tedder, T. F. IL-10-producing regulatory B cells (B10 cells) in autoimmune disease. *Arthritis Res. Ther.* **15 Suppl 1**, S1 (2013).
72. Goode, I., Xu, H. & Ildstad, S. T. Regulatory B cells: the new “it” cell. *Transplant. Proc.* **46**, 3–8 (2014).
73. Marín, N. *et al.* Regulatory lymphocytes are key factors in MHC-independent resistance to EAE. *J. Immunol. Res.* **2014**, 156380 (2014).
74. Matsushita, T. Regulatory B Cells in Mouse Models of Systemic Lupus Erythematosus (SLE). *Methods Mol. Biol.* **1190**, 195–205 (2014).
75. Elizabeth C. Rosser, C. M. Regulatory B Cells in Experimental Mouse Models of Arthritis. *Methods Mol. Biol.* **1190**, 183–194 (2014).
76. Jung, D., Giallourakis, C., Mostoslavsky, R. & Alt, F. W. Mechanism and control of V(D)J recombination at the immunoglobulin heavy chain locus. *Annu. Rev. Immunol.* **24**, 541–70 (2006).
77. Kenneth A. Newell1, Adam Asare2, 3, Allan D. Kirk1, Trang D. Gisler2, 3, Kasia Bourcier2, 3, Manikkam Suthanthiran4, William J. Burlingham5, William H. Marks6, Ignacio Sanz7, Robert I. Lechler8, 9, Maria P. Hernandez-Fuentes8, 9, Laurence A. Turka3, 10 an, 1. Identification of a B cell signature associated with renal transplant tolerance in humans. *J Clin Invest* **120**, 1836–1847 (2010).
78. Lanzavecchia, A. Receptor-Mediated Antigen Uptake and its Effect on Antigen Presentation to Class II-Restricted T Lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.* **8**, 773–793 (1990).
79. Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman, Jordan S. Pober, A. H. L. *Cellular and molecular immunology (5th ed.)*. (2003).
80. Guo, C. *et al.* CTCF-binding elements mediate control of V (D) J recombination. *Nature* **477**, 424–430 (2011).
81. Ebert, A., Medvedovic, J., Tagoh, H., Schwickert, T. a & Busslinger, M. Control of Antigen Receptor Diversity through Spatial Regulation of V(D)J Recombination. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **78**, 11–21 (2013).



82. Tobón, G. J., Izquierdo, J. H. & Cañas, C. a. B lymphocytes: development, tolerance, and their role in autoimmunity-focus on systemic lupus erythematosus. *Autoimmune Dis.* **2013**, 827254 (2013).
83. Oettinger, A. G. W. M. & M. A. RAG: a recombinase diversified. *Nat. Immunol.* **10**, 817–821 (2009).
84. Schroeder, H. W. & Cavacini, L. Structure and function of immunoglobulins. *J. Allergy Clin. Immunol.* **125**, S41–52 (2010).
85. Tobón, G. J., Izquierdo, J. H. & Cañas, C. a. B lymphocytes: development, tolerance, and their role in autoimmunity-focus on systemic lupus erythematosus. *Autoimmune Dis.* **2013**, 827254 (2013).
86. Bruhns, P. Review article Properties of mouse and human IgG receptors and their contribution to disease models. **119**, 5640–5649 (2012).
87. Kim, Y.-M. *et al.* Monovalent ligation of the B cell receptor induces receptor activation but fails to promote antigen presentation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 3327–32 (2006).
88. Tulp, A., Verwoerd, D. & Dobberstein, B. Isolation and characterization of the intracellular MHC class II compartment. *Nature* **369**, 120–126 (1994).
89. Drake, L. BCR ubiquitination controls BCR-mediated antigen processing and presentation. *Blood* **108**, 4086–4093 (2006).
90. Bryant, P. & Ploegh, H. Class II MHC peptide loading by the professionals. *Curr. Opin. Immunol.* **16**, 96–102 (2004).
91. Harris, N. L. & Ronchese, F. The role of B7 costimulation in T-cell immunity. *Immunol. Cell Biol.* **77**, 304–11 (1999).
92. Collins, M., Ling, V. & Carreno, B. M. The B7 family of immune-regulatory ligands. *Genome Biol.* **6**, 223 (2005).
93. Kouskoff, V. & Nemazee, D. Role of receptor editing and revision in shaping the B and T lymphocyte repertoire. *Life Sci.* **69**, 1105–13 (2001).
94. Pelanda, R. & Torres, R. M. Receptor editing for better or for worse. *Curr. Opin. Immunol.* **18**, 184–90 (2006).
95. Goodnow, C. C., Sprent, J., Fazekas de St Groth, B. & Vinuesa, C. G. Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity. *Nature* **435**, 590–7 (2005).
96. Cornall, R. J., Goodnow, C. C. & Cyster, J. G. The regulation of self-reactive B cells. *Curr. Opin. Immunol.* **7**, 804–11 (1995).
97. Ekland, E. H., Forster, R., Lipp, M. & Cyster, J. G. Requirements for Follicular Exclusion and Competitive Elimination of Autoantigen-Binding B Cells. *J. Immunol.* **172**, 4700–4708 (2004).
98. Muzzio, D., Zygmunt, M. & Jensen, F. The Role of Pregnancy-Associated Hormones in the Development and Function of Regulatory B Cells. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **5**, 39 (2014).
99. JW., S. Peripheral tolerance induction: lessons from immune privileged sites and tissues. *Transpl. Proc.* **28**, 2066–70 (1996).
100. Thomas, J. W. Antigen-specific responses in autoimmunity and tolerance. *Immunol. Res.* **23**, 235–44 (2001).
101. Manz RA1, Arce S, Cassese G, Hauser AE, Hiepe F, R. A. Humoral immunity and long-lived plasma cells. *Curr Opin Immunol.* **14**, 517–21 (2002).
102. Levesque, M. C. & St Clair, E. W. B cell-directed therapies for autoimmune disease and correlates of disease response and relapse. *J. Allergy Clin. Immunol.* **121**, 13–21; quiz 22–3 (2008).
103. LeBien, T. & Tedder, T. B lymphocytes : how they develop and function. *Blood* **112**, 1570–1580 (2008).
104. Ekö SL1, van V. R. Rituximab and lupus - a promising pair? *Curr Rheumatol Rep.* **16**, 444 (2014).
105. Wong, F. S. *et al.* Investigation of the Role of B-Cells in Type 1 Diabetes in the NOD Mouse. *Diabetes* **53**, 2581–2587 (2004).
106. Correale J1, E. T. Regulatory B cells, helminths, and multiple sclerosis. *Methods Mol Biol.* **1190**, 257–69 (2014).
107. Gordon, J. W., Scangos, G. a, Plotkin, D. J., Barbosa, J. a & Ruddle, F. H. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **77**, 7380–4 (1980).
108. Silveira PA1, Johnson E, Chapman HD, Bui T, Tisch RM, S. D. The preferential ability of B lymphocytes to act as diabetogenic APC in NOD mice depends on expression of self-antigen-specific immunoglobulin receptors. *Eur. J. Immunol.* **32**, 3657–66 (2002).

109. Acevedo-Suárez, C. a, Hulbert, C., Woodward, E. J. & Thomas, J. W. Uncoupling of anergy from developmental arrest in anti-insulin B cells supports the development of autoimmune diabetes. *J. Immunol.* **174**, 827–33 (2005).
110. Cambier, J. C. & Getahun, A. B cell activation versus anergy; the antigen receptor as a molecular switch. *Immunol. Lett.* **128**, 6–7 (2010).
111. John C. Cambier, Stephen B. Gauld, K. T. M. & B. J. V. B-cell anergy: from transgenic models to naturally occurring anergic B cells? *Nat. Rev. Immunol.* 633–643 (2007).
112. Bluestone, J. a., Herold, K. & Eisenbarth, G. Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes. *Nature* **464**, 1293–1300 (2010).
113. Bate KL1, J. G. 3: Preventing complications of diabetes. *Med J Aust.* **179**, 498–503
114. Weir, G. C. & Bonner-weir, S. Islets of Langerhans: the Puzzle of Intra-islet Interactions and Their Relevance to Diabetes. **85**, 983–987 (1990).
115. Kulkarni, R. N. The islet  $\beta$ -cell. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **36**, 365–371 (2004).
116. Arnes, L., Hill, J. T., Gross, S., Magnuson, M. a & Sussel, L. Ghrelin expression in the mouse pancreas defines a unique multipotent progenitor population. *PLoS One* **7**, e52026 (2012).
117. Tang, S.-C., Chiu, Y.-C., Hsu, C.-T., Peng, S.-J. & Fu, Y.-Y. Plasticity of Schwann cells and pericytes in response to islet injury in mice. *Diabetologia* **56**, 2424–34 (2013).
118. Ahren, B. Islet nerves in focus—defining their neurobiological and clinical role. *Diabetologia* **55**, 3152–4 (2012).
119. Tsui, H., Razavi, R., Chan, Y., Yantha, J. & Dosch, H.-M. “Sensing” autoimmunity in type 1 diabetes. *Trends Mol. Med.* **13**, 405–13 (2007).
120. Tsui, H. *et al.* Islet glia, neurons, and beta cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1150**, 32–42 (2008).
121. Holzmann, B. Modulation of immune responses by the neuropeptide CGRP. *Amino Acids* **45**, 1–7 (2013).
122. Assas, B. M., Pennock, J. I. & Miyan, J. a. Calcitonin gene-related peptide is a key neurotransmitter in the neuro-immune axis. *Front. Neurosci.* **8**, 23 (2014).
123. Razavi, R. *et al.* TRPV1+ sensory neurons control beta cell stress and islet inflammation in autoimmune diabetes. *Cell* **127**, 1123–35 (2006).
124. Sadeh, M. *et al.* Association of the M 315 I Variant in the Transient Receptor Potential Vanilloid Receptor- 1 ( TRPV 1 ) Gene with Type 1 Diabetes in an Ashkenazi Jewish Population. **15**, 545–548 (2013).
125. Barreiroa, S. C., , M. Rodríguez Rigualb, G. Bueno Lozanoc, J. P. L. S. & B. González Pelegríne, M. P. R. V. f y M. L. C. D. Epidemiology of type 1 diabetes mellitus in children in Spain. *An Pediatr* 1–12 (2014).
126. Zimmet PZ1, Tuomi T, Mackay IR, Rowley MJ, Knowles W, Cohen M, L. D. Latent autoimmune diabetes mellitus in adults (LADA): the role of antibodies to glutamic acid decarboxylase in diagnosis and prediction of insulin dependency. *Diabet Med.* **11**, 299–303 (1994).
127. David M Maahs, Nancy A West, Jean M. Lawrence, And Mayer-Davis, E. J. Epidemiology of Type 1 Diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am.* **39**, 481–497 (2010).
128. Ziegler, A.-G. & Nepom, G. T. Prediction and pathogenesis in type 1 diabetes. *Immunity* **32**, 468–78 (2010).
129. Tsai, S. & Santamaria, P. MHC Class II Polymorphisms, Autoreactive T-Cells, and Autoimmunity. *Front. Immunol.* **4**, 321 (2013).
130. Belle, T. O. M. L. V. A. N., Coppieters, K. E. N. T. & Herrath, M. G. V. O. N. Type 1 Diabetes : Etiology , Immunology , and Therapeutic Strategies. *Physiol Rev* 79–118 (2011). doi:10.1152/physrev.00003.2010.
131. Nielsen LB1, Mortensen HB, Chiarelli F, Holl R, Swift P, de Beaufort C, Pociot F, Hougaard P, Gammeltoft S, Knip M, H. L. H. Impact of IDDM2 on disease pathogenesis and progression in children with newly diagnosed type 1 diabetes: reduced insulin antibody titres and preserved beta cell function. *Diabetologia* **49**, 71–4 (2006).
132. Fichna M1, Zurawek M, Fichna P, Ziółkowska-Suchanek I, Januszkiewicz D, N. J. Polymorphic variant at the IL2 region is associated with type 1 diabetes and may affect serum levels of interleukin-2. *Mol Biol Rep.* **40**, 6957–63 (2013).
133. Liu J1, Zhang HX, Feng GY, H. L. Significantly association of diabetes mellitus with CTLA-4 gene polymorphisms based on a meta-analysis of epidemiological evidence in Asians and non-Asians. *Genet Mol Res.* **12**, 3919–30 (2013).
134. Bakay, M., Pandey, R. & Hakonarson, H. Genes involved in type 1 diabetes: an update. *Genes (Basel).* **4**, 499–521 (2013).

135. Getts, D. R., Chastain, E. M. L., Terry, R. L. & Miller, S. D. Virus infection, antiviral immunity, and autoimmunity. *Immunol. Rev.* **255**, 197–209 (2013).
136. Coppieters, K. T., Wiberg, a, Tracy, S. M. & von Herrath, M. G. Immunology in the clinic review series: focus on type 1 diabetes and viruses: the role of viruses in type 1 diabetes: a difficult dilemma. *Clin. Exp. Immunol.* **168**, 5–11 (2012).
137. Okada, H., Kuhn, C., Feillet, H. & Bach, J.-F. The “hygiene hypothesis” for autoimmune and allergic diseases: an update. *Clin. Exp. Immunol.* **160**, 1–9 (2010).
138. Foulis AK1, Farquharson MA, M. A. Immunoreactive alpha-interferon in insulin-secreting beta cells in type 1 diabetes mellitus. *Lancet* **19**, 1423–7 (1987).
139. Stene, L. C. & Rewers, M. Immunology in the clinic review series; focus on type 1 diabetes and viruses: the enterovirus link to type 1 diabetes: critical review of human studies. *Clin. Exp. Immunol.* **168**, 12–23 (2012).
140. Laitinen OH1, Honkanen H, P. O. et. al. Coxsackievirus B1 is associated with induction of  $\beta$ -cell autoimmunity that portends type 1 diabetes. *Diabetes* **63**, 446–55 (2014).
141. Yoon JW, Austin M, Onodera T, N. A. Virus-Induced Diabetes Mellitus Isolation of a Virus from the Pancreas of a Child with Diabetic Ketoacidosis. *N Engl J Med* **21**, 1173–1179 (1979).
142. Honeyman, M. C. & Harrison, L. C. Congenital rubella, diabetes and HLA. *Diabetologia* **52**, 371–2; (2009).
143. Sotgiu, S., Angius, A., Embry, A., Rosati, G. & Musumeci, S. Hygiene hypothesis: innate immunity, malaria and multiple sclerosis. *Med. Hypotheses* **70**, 819–25 (2008).
144. Burbelo, P. D. *et al.* Extrapancreatic autoantibody profiles in type I diabetes. *PLoS One* **7**, e45216 (2012).
145. Campbell-thompson, M. *et al.* Network for Pancreatic Organ Donors with Diabetes (nPOD): developing a tissue biobank for type 1 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 608–617 (2012). doi:10.1002/dmrr
146. Richardson, S. J., Willcox, A., Bone, A. J., Morgan, N. G. & Foulis, A. K. Immunopathology of the human pancreas in type-I diabetes. *Semin. Immunopathol.* **33**, 9–21 (2011).
147. Itoh, N. *et al.* Mononuclear cell infiltration and its relation to the expression of major histocompatibility complex antigens and adhesion molecules in pancreas biopsy specimens from newly diagnosed insulin-dependent diabetes mellitus patients. *J. Clin. Invest.* **92**, 2313–22 (1993).
148. Santamaria, P. The long and winding road to understanding and conquering type 1 diabetes. *Immunity* **32**, 437–45 (2010).
149. Serreze, D. & Chapman, H. B Lymphocytes Are Essential for the Initiation of T Cell-mediated Autoimmune Diabetes : Analysis of a New “Speed Congenic” Stock of NODIgu null Mice. *J. ...* **184**, 2049–53 (1996).
150. Stadinski, B., Kappler, J. & Eisenbarth, G. S. Molecular targeting of islet autoantigens. *Immunity* **32**, 446–56 (2010).
151. Shao, S. *et al.* Th17 cells in type 1 diabetes. *Cell. Immunol.* **280**, 16–21 (2012).
152. Crawford, F. *et al.* Specificity and detection of insulin-reactive CD4+ T cells in type 1 diabetes in the nonobese diabetic (NOD) mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 16729–34 (2011).
153. Roep, B. O. & Peakman, M. Antigen targets of type 1 diabetes autoimmunity. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2**, (2012).
154. Tsai, S., Clemente-Casares, X. & Santamaria, P. CD8(+) Tregs in autoimmunity: learning “self”-control from experience. *Cell. Mol. Life Sci.* **68**, 3781–95 (2011).
155. Wang P1, Z. S. Regulatory T cells and B cells: implication on autoimmune diseases. *Int J Clin Exp Pathol.* **15**, 2668–74 (2013).
156. Jeker, L. T., Bour-Jordan, H. & Bluestone, J. a. Breakdown in peripheral tolerance in type 1 diabetes in mice and humans. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2**, a007807 (2012).
157. Noorchashm, H. *et al.* I-Ag7-mediated antigen presentation by B lymphocytes is critical in overcoming a checkpoint in T cell tolerance to islet beta cells of nonobese diabetic mice. *J. Immunol.* **163**, 743–50 (1999).
158. STEPHAN *et al.* Development of Type 1 Diabetes Despite severe hereditary B-Cell deficiency. *N Engl J Med* **345**, 1036–1040 (2001).
159. Noorchashm, H. *et al.* Impaired CD4 T Cell Activation Due to Reliance Upon B Cell-Mediated Costimulation in Nonobese Diabetic (NOD) Mice. *J. Immunol.* **165**, 4685–4696 (2000).
160. Hinman, R. M., Smith, M. J. & Cambier, J. C. B cells and type 1 diabetes ...in mice and men. *Immunol. Lett.* 1–5 (2014). doi:10.1016/j.imlet.2014.01.010
161. Höglund, P. *et al.* Initiation of autoimmune diabetes by developmentally regulated presentation of islet cell antigens in the pancreatic lymph nodes. *J. Exp. Med.* **189**, 331–9 (1999).

162. Unanue, E. R. *Antigen presentation in the autoimmune diabetes of the NOD mouse*. *Annu. Rev. Immunol.* **32**, 579–608 (2014).
163. Mariño, E., Tan, B., Binge, L., Mackay, C. R. & Grey, S. T. B-cell cross-presentation of autologous antigen precipitates diabetes. *Diabetes* **61**, 2893–905 (2012).
164. David Parra,\* Aja M. Rieger,†, 1 Jun Li,\* 1 Yong-An Zhang,\* Louise M. Randall,\* Christopher A. Hunter,\* Daniel R. Barreda,† and J. Oriol Sunyer\*, 2. Pivotal Advance: Peritoneal cavity B-1 B cells have phagocytic and microbicidal capacities and present phagocytosed antigen to CD4+ T cells. *J Leukoc Biol.* **91**, 525–536 (2012).
165. Hulbert, C. & Riseili, B. Cutting edge: B cell specificity contributes to the outcome of diabetes in nonobese diabetic mice. *J. ...* 5535–5538 (2001). at <<http://www.jimmunol.org/content/167/10/5535.short>>
166. Kendall, P. L., Woodward, E. J., Hulbert, C. & Thomas, J. W. Peritoneal B cells govern the outcome of diabetes in non-obese diabetic mice. *Eur. J. Immunol.* **34**, 2387–95 (2004).
167. Hussain, S. & Delovitch, T. L. Dysregulated B7-1 and B7-2 Expression on Nonobese Diabetic Mouse B Cells Is Associated with Increased T Cell Costimulation and the Development of Insulinitis. *J. Immunol.* **174**, 680–687 (2005).
168. Serreze, D. V *et al.* B lymphocytes are critical antigen-presenting cells for the initiation of T cell-mediated autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J. Immunol.* ( **161**, 3912–8 (1998).
169. Siri Atma W. Greeley<sup>1</sup>, Makoto Katsumata<sup>2</sup>, Liping Yu<sup>3</sup>, George S. Eisenbarth<sup>3</sup>, Daniel J. Moore<sup>1</sup>, Heidi Goodarzi<sup>1</sup>, Clyde F. Barker<sup>1</sup>, A. N. & H. N. Elimination of maternally transmitted autoantibodies prevents diabetes in nonobese diabetic mice. *Nat. Med.* **8**, 399–402 (2002).
170. Massa, O. *et al.* Serological Proteome Analysis (SERPA) as a tool for the identification of new candidate autoantigens in type 1 diabetes. *J. Proteomics* **82**, 263–73 (2013).
171. Watkins, R. a, Evans-Molina, C., Blum, J. S. & Dimeglio, L. a. Established and emerging biomarkers for the prediction of type 1 diabetes: a systematic review. *Transl Res* **5244**, 00078–4 (2014).
172. Hall TR<sup>1</sup>, Thomas JW, Padoa CJ, Torn C, Landin-Olsson M, Ortqvist E, H. C. Longitudinal epitope analysis of insulin-binding antibodies in type 1 diabetes. *Clin Exp Immunol.* **146**, 9–14 (2006).
173. Boettler T<sup>1</sup>, Pagni PP, Jaffe R, Cheng Y, Zerhouni P, von H. M. The clinical and immunological significance of GAD-specific autoantibody and T-cell responses in type 1 diabetes. *J Autoimmun.* **44**, 40–8 (2013).
174. Canivell, S. & Gomis, R. Diagnosis and classification of autoimmune diabetes mellitus. *Autoimmun. Rev.* **13**, 403–7 (2014).
175. Wenzlau, J. M. *et al.* The cation efflux transporter ZnT8 (Slc30A8) is a major autoantigen in human type 1 diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 17040–5 (2007).
176. Pihoker, C., Gilliam, L. K., Hampe, C. S. & Lernmark, A. Autoantibodies in diabetes. *Diabetes* **54 Suppl 2**, S52–61 (2005).
177. Livneh A, Avraham H, Elias D, Sack J, Cohen IR, E. Z. A human monoclonal antibody to insulin. *Diabetes* **35**, 68–73 (1986).
178. Brogren CH, Hirsch F, Wood P, Druet P, P. P. Production and characterization of a monoclonal islet cell surface autoantibody from the BB rat. *Diabetologia* **29**, 330–3 (1986).
179. Supon P<sup>1</sup>, Stecha P, H. K. Anti-islet cell antibodies from NOD mice. *Diabetes* **Nov39**, 1366–72 (1990).
180. Lieberman, S. M. & DiLorenzo, T. P. A comprehensive guide to antibody and T-cell responses in type 1 diabetes. *Tissue Antigens* **62**, 359–77 (2003).
181. Hopppu S<sup>1</sup>, Härkönen T, Ronkainen MS, Akerblom HK, K. M. C. D. in F. S. G. IA-2 antibody epitopes and isotypes during the prediabetic process in siblings of children with type 1 diabetes. *J Autoimmun.* **23**, 361–70 (2004).
182. Puertas, M. C. *et al.* Peripherin Is a Relevant Neuroendocrine Autoantigen Recognized by Islet-Infiltrating B Lymphocytes. *J. Immunol.* **178**, 6533–6539 (2007).
183. Tsui, H. *et al.* Targeting of Pancreatic Glia in Type 1 Diabetes. *Diabetes* **57**, (2008).
184. Buder, B., Alexander, M., Krishnan, R., Chapman, D. W. & Lakey, J. R. Encapsulated Islet Transplantation: Strategies and Clinical Trials. *Immune Netw.* **13**, 235–239 (2013).
185. Bhattacharya P<sup>1</sup>, Fan J<sup>1</sup>, Haddad C<sup>1</sup>, Essani A<sup>1</sup>, Gopisetty A<sup>1</sup>, Elshabrawy HA<sup>1</sup>, Vasu C<sup>2</sup>, P. B. A novel pancreatic  $\beta$ -cell targeting bispecific-antibody (BsAb) can prevent the development of type 1 diabetes in NOD mice. *Clin Immunol.* **153**, 187–98 (2014).
186. Hu C<sup>1</sup>, Ding H, Zhang X, Wong FS, W. L. Combination treatment with anti-CD20 and oral anti-CD3 prevents and reverses autoimmune diabetes. *Diabetes* **62**, 2849–58 (2013).

187. Rydén, A. K., Wesley, J. D., Coppieters, K. T. & Von Herrath, M. G. Non-antigenic and antigenic interventions in type 1 diabetes. *Hum. Vaccin. Immunother.* **10**, 838–846 (2013).
188. Xu, S. TNF inhibitor therapy for rheumatoid arthritis (Review). *Biomed. Reports* **1**, 177–184 (2013).
189. Clemente-Casares, X., Tsai, S., Huang, C. & Santamaria, P. Antigen-specific therapeutic approaches in Type 1 diabetes. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2**, a007773 (2012).
190. Morel, P. a. Dendritic Cell Subsets in Type 1 Diabetes: Friend or Foe? *Front. Immunol.* **4**, 415 (2013).
191. Tesch GH1, A. T. Rodent models of streptozotocin-induced diabetic nephropathy. *Nephrol. (Carlton)*. **12**, 261–6 (2007).
192. Rees, D. a & Alcolado, J. C. Animal models of diabetes mellitus. *Diabet. Med.* **22**, 359–70 (2005).
193. Anderson, M. S. & Bluestone, J. a. The NOD mouse: a model of immune dysregulation. *Annu. Rev. Immunol.* **23**, 447–85 (2005).
194. Hill NJ1, Lyons PA, Armitage N, Todd JA, Wicker LS, P. L. NOD Idd5 locus controls insulinitis and diabetes and overlaps the orthologous CTLA4/IDDM12 and NRAMP1 loci in humans. *Diabetes* **49**, 1744–7 (2000).
195. McGuire HM1, Vogelzang A, Hill N, Flodström-Tullberg M, Sprent J, K. C. Loss of parity between IL-2 and IL-21 in the NOD Idd3 locus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **106**, 19438–43 (2009).
196. Stratmann, T. *et al.* The I-Ag7 MHC Class II Molecule Linked to Murine Diabetes Is a Promiscuous Peptide Binder. *J. Immunol.* **165**, 3214–3225 (2000).
197. John A. Todd, J. I. B. & H. O. M. HLA-DQ beta gene contributes to susceptibility and resistance to insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature* **329**, 559–604 (1987).
198. Naumov, Y. N. *et al.* Activation of CD1d-restricted T cells protects NOD mice from developing diabetes by regulating dendritic cell subsets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 13838–43 (2001).
199. Kataoka S, Satoh J, Fujiya H, Toyota T, Suzuki R, Itoh K, K. K. Immunologic aspects of the nonobese diabetic (NOD) mouse. Abnormalities of cellular immunity. *Diabetes* **32**, 247–53 (1983).
200. King, C., Ilic, A., Koelsch, K. & Sarvetnick, N. Homeostatic expansion of T cells during immune insufficiency generates autoimmunity. *Cell* **117**, 265–77 (2004).
201. Mariño, E. *et al.* Marginal-zone B-cells of nonobese diabetic mice expand with diabetes onset, invade the pancreatic lymph nodes, and present autoantigen to diabetogenic T-cells. *Diabetes* **57**, 395–404 (2008).
202. Marie-Christine Many, Serge Maniratunga, J.-F. D. The non-obese diabetic (NOD) mouse: An animal model for autoimmune thyroiditis. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* **104**, 17–20 (1996).
203. Hjelmervik, T. O. R. *et al.* The influence of the NOD Nss1/Idd5 loci on sialadenitis and gene expression in salivary glands of congenic mice. *Arthritis Res. Ther.* **9**, R99 (2007).
204. Salomon, B. *et al.* Development of spontaneous autoimmune peripheral polyneuropathy in B7-2-deficient NOD mice. *J. Exp. Med.* **194**, 677–84 (2001).
205. Söderström I1, Bergman ML, Colucci F, Lejon K, Bergqvist I, H. D. Establishment and characterization of RAG-2 deficient non-obese diabetic mice. *Scand J Immunol.* **43**, 525–30 (1996).
206. Krishnamurthy, B. *et al.* Autoimmunity to Both Proinsulin and IGRP Is Required for Diabetes in Nonobese Diabetic 8.3 TCR Transgenic Mice. *J. Immunol.* **180**, 4458–4464 (2008).
207. Carrillo, J. *et al.* Islet-infiltrating B-cells in nonobese diabetic mice predominantly target nervous system elements. *Diabetes* **54**, 69–77 (2005).
208. Puertas, M. C. *et al.* Peripherin Is a Relevant Neuroendocrine Autoantigen. (2007).
209. Carrillo, J. *et al.* Anti-peripherin B lymphocytes are positively selected during diabetogenesis. *Mol. Immunol.* **45**, 3152–62 (2008).
210. Strom, A. *et al.* Peripherin-Reactive Antibodies in Mouse , Rabbit , and Human Blood research articles. 1203–1208 (2010).
211. Koenig-Marrony, S. *et al.* Natural autoreactive B cells in transgenic mice reproduce an apparent paradox to the clonal tolerance theory. *J. Immunol.* **166**, 1463–70 (2001).
212. Larivière, R. C., Nguyen, M. D., Ribeiro-da-Silva, a & Julien, J.-P. Reduced number of unmyelinated sensory axons in peripherin null mice. *J. Neurochem.* **81**, 525–32 (2002).
213. Sacha A Malin1, B. M. D. & D. C. M. Production of dissociated sensory neuron cultures and considerations for their use in studying neuronal function and plasticity. *Nat. Protoc.* **2**, 152–160 (2007).

214. Ponsati, B. *et al.* An inhibitor of neuronal exocytosis (DD04107) displays long-lasting in vivo activity against chronic inflammatory and neuropathic pain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **341**, 634–45 (2012).
215. Cooke, B. M. P. *et al.* Immunoglobulin Signal Transduction Guides the Specificity of B Cell-T Cell Interactions and Is Blocked in Tolerant Self-reactive B Cells. *J. Exp. Med.* **179**, 425–438 (1994).
216. Garabatos, N. *et al.* In vivo detection of peripherin-specific autoreactive B cells during type 1 diabetes pathogenesis. *J. Immunol.* **192**, 3080–90 (2014).
217. Nilsson, P. & Saido, T. C. Dual roles for autophagy: degradation and secretion of Alzheimer's disease A $\beta$  peptide. *Bioessays* **36**, 570–8 (2014).
218. Alafuzoff, I. & Parkkinen, L. Staged pathology in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* **20 Suppl 1**, S57–61 (2014).
219. Kim, S. & Kim, K.-T. Therapeutic Approaches for Inhibition of Protein Aggregation in Huntington's Disease. *Exp. Neurobiol.* **23**, 36–44 (2014).
220. Ogawa, M. & Furukawa, Y. A seeded propagation of Cu, Zn-superoxide dismutase aggregates in amyotrophic lateral sclerosis. *Front. Cell. Neurosci.* **8**, 83 (2014).
221. Nixon, R., Yang, D. & Lee, J. Neurodegenerative lysosomal disorders. *Autophagy* 590–599 (2008). at <<http://www.landesbioscience.com/journals/autophagy/NixonAUTO4-5.pdf>>
222. Calderó J1, Brunet N, Tarabal O, Piedrafita L, Hereu M, Ayala V, E. J. Lithium prevents excitotoxic cell death of motoneurons in organotypic slice cultures of spinal cord. *Neuroscience.* **165**, 1353–69 (2010).
223. Kamiya, H., Zhang, W. & Sima, a a F. Degeneration of the Golgi and neuronal loss in dorsal root ganglia in diabetic BioBreeding/Worcester rats. *Diabetologia* **49**, 2763–74 (2006).
224. Khachatryan A1, Guerder S, Palluault F, Cote G, Solimena M, Valentijn K, Millet I, Flavell RA, V. A. Targeted expression of the neuropeptide calcitonin gene-related peptide to beta cells prevents diabetes in NOD mice. *J. Immunol.* **158**, 1409–16 (1997).
225. Zhao, D. *et al.* Substance P-stimulated interleukin-8 expression in human colonic epithelial cells involves Rho family small GTPases. *Biochem J.* **672**, 665–672 (2002).
226. Muñoz, M. & Coveñas, R. Involvement of substance P and the NK-1 receptor in human pathology. *Amino Acids* (2014). doi:10.1007/s00726-014-1736-9
227. Engel, M. a, Becker, C., Reeh, P. W. & Neurath, M. F. Role of sensory neurons in colitis: increasing evidence for a neuroimmune link in the gut. *Inflamm. Bowel Dis.* **17**, 1030–3 (2011).
228. Camprubi-Robles, M., Planells-Cases, R. & Ferrer-Montiel, a. Differential contribution of SNARE-dependent exocytosis to inflammatory potentiation of TRPV1 in nociceptors. *FASEB J.* **23**, 3722–33 (2009).
229. Engel, M. A. *et al.* TRPA1 and Substance P Mediate Colitis in Mice. *Gastroenterology* **141**, 1346–1358 (2011).
230. Hansen, T. The Nobel Prize in physiology or medicine 2007. *Scand. J. Immunol.* **66**, 603 (2007).
231. Oeser, J. K. *et al.* Deletion of the G6pc2 gene encoding the islet-specific glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related protein does not affect the progression or incidence of type 1 diabetes in NOD/ShiLtJ mice. *Diabetes* **60**, 2922–7 (2011).
232. Xiao, S. *et al.* An aggregate-inducing peripherin isoform generated through intron retention is upregulated in amyotrophic lateral sclerosis and associated with disease pathology. *J. Neurosci.* **28**, 1833–40 (2008).
233. J. Carrascal, J. Carrillo, B. Arpa, I. Pujol-Autonell, R. Planas, E. Rossell, C. Mora, D. mauricio, R. Ampudia, M. V.-P. and J. V. Autoreactive B Lymphocytes can reach maturation and promote type 1 diabetes despite the existence of active mechanisms of selection in NOD mice. *J. Autoimmun.* (2014).
234. Chen, K. & Cerutti, A. The function and regulation of immunoglobulin D. *Curr. Opin. Immunol.* **23**, 345–52 (2011).
235. Edholm, E.-S., Bengten, E. & Wilson, M. Insights into the function of IgD. *Dev. Comp. Immunol.* **35**, 1309–16 (2011).
236. Kendall, P. L., Woodward, E. J., Hulbert, C. & Thomas, J. W. Peritoneal B cells govern the outcome of diabetes in non-obese diabetic mice. *Eur. J. Immunol.* **34**, 2387–95 (2004).
237. Xu, Z., Butfiloski, E. J., Sobel, E. S. & Morel, L. Mechanisms of Peritoneal B-1a Cells Accumulation Induced by Murine Lupus Susceptibility Locus Sle2. *J. Immunol.* **173**, 6050–6058 (2004).
238. Tsubata T1, Murakami M, H. T. Antigen-receptor cross-linking induces peritoneal B-cell apoptosis in normal but not autoimmunity-prone mice. *Curr. Biol.* **4**, 8–17 (1994).

- 239. Kendall, P. L. *et al.* Tolerant anti-insulin B cells are effective APCs. *J. Immunol.* **190**, 2519–26 (2013).
- 240. Puertas, M. C. *et al.* Phenotype and functional characteristics of islet-infiltrating B-cells suggest the existence of immune regulatory mechanisms in islet milieu. *Diabetes* **56**, 940–9 (2007).

